BINDUNG VON HISTIDIN-PEPTIDEN AN POLYMERFIXIERTE PORPHYRINSYSTEME

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Kenichi Shinohara
aus Nagano/Japan

1984

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536517_0040

BINDUNG VON HISTIDIN-PEPTIDEN AN POLYMERFIXIERTE PORPHYRINSYSTEME

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Kenichi Shinohara
aus Nagano/Japan

1984

Tag der mündlichen Prüfung: 5.11.1984

Dekan:	Prof. Dr. K.-A. Kovar
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. E. Bayer
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. W. Voelter

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Ernst Bayer in der Zeit von Mai 1981 bis April 1984 am Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen durchgeführt.

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. Ernst Bayer danke ich für die Stellung des Themas und für seine großzügige Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

INHALTSVERZEICHNIS

A.	ALLGEMEINER TEIL	1
1.	Struktur-Funktion-Beziehung bei Hämoglobin und Myoglobin	1
1.1.	Molekulare Strukturen des Hämo- und Myoglobins	1
1.2.	Reversible Oxygenierung des Hämoglobins und Myoglobins	4
1.2.1.	MO-Diagramm der Oxo-Form des Eisen-Porphyrins	4
1.2.2.	Stabilisierung der Fe^{2+}-O_2-Bindung bei Hämoglobin und Myoglobin	6
1.2.3.	Reaktivität von Hämproteinen gegenüber Sauerstoff	10
1.3.	Funktionelle Unterschiede zwischen Hämoglobin und Myoglobin	14
2.	Untersuchungen der "Hämpolymer"-Modellsubstanzen für Hämoglobin und Myoglobin	18
2.1.	Die "Hämpolymer"-Modellsubstanzen	18
2.2.	Strategie der "Hämpolymer"-Synthese	20
2.2.1.	Synthese des histidinhaltigen POE-Peptids	20
2.2.2.	Synthese der "Hämpolymer"-Modellsubstanzen	22
2.3.	Aggregation der "Hämpolymer"-Modellsubstanzen in Wasser	24
2.4.	Ferro-Komplexe der "Hämpolymer"-Modellsubstanzen	29
2.5.	Reaktivität der "Hämpolymer"-Modellsubstanzen gegenüber Sauerstoff und Kohlenmonoxid	33

2.6.	Reaktionsmechanismen der "Hämpolymer"-Modellsubstanzen	38
2.6.1.	Funktionelle Unterschiede zwischen Myoglobin und Peroxidase aus Meerrettich	38
2.6.2.	Ferryl-oxo-Komplex als intermediärer Sauerstoff-Komplex	40
2.6.3.	Oxidation des CO-Komplexes bei den "Hämpolymer"-Modellsubstanzen	44
2.7.	Redoxpotential der "Hämpolymer"-Modellsubstanzen	45
3.	Koordination der Histidin-Peptide an Eisen-Porphyrin in Wasser	53
3.1.	Signifikanz des Histidinrestes als proximaler Ligand in Hämproteinen	53
3.2.	Strategie der Histidin-Peptid-Synthese	54
3.2.1.	Syntheseverfahren für Histidin-Peptide	54
3.2.2.	Zuordnung der ^{13}C-NMR-Spektren des Histidin-Peptids	58
3.3.	Molekulare Konformation der Histidin-Peptide	63
3.3.1.	Tautomerie der Histidin-Peptide in DMSO-d_6	63
3.3.2.	Titrationskurve der Histidin-Peptide	67
3.3.3.	Circulardichroismus der Histidin-Peptide	68
3.4.	Komplexbildung der Histidin-Peptide mit dem Eisen(+2)-Porphyrin in Wasser	72
3.5.	Reaktivität des an Histidin-Peptid gebundenen Hämpolymers (1) gegenüber Sauerstoff und Kohlenmonoxid	80
3.6.	Redoxpotential des an Histidin-Peptid gebundenen Hämpolymers (1)	83

B.	EXPERIMENTELLER TEIL	86
1.	Geräte	86
2.	Chemikalien und Materialien	87
3.	Aminosäure-Derivate als Ausgangsstoffe	88
3.1.	Aliphatische Aminosäure-Derivate	88
3.2.	Histidin-Derivate	88
3.3.	Serin-Derivate	91
3.4.	Lysin-Derivate	93
4.	Synthese von "Hämpolymer"-Modellsubstanzen	95
4.1.	Veresterung von POE_{10000} mit Boc-Gly-OH	95
4.2.	Synthese von $[Z\text{-Ala-His(Trt)-Lys(Boc)-Leu-Gly-}POE_{5000}]_2$	95
4.3.	Abspaltung der N_{ϵ}-Boc- und N_{Im}-Trt-Gruppen vom $[Z\text{-Ala-His(Trt)-Lys(Boc)-Leu-Gly-}POE_{5000}]_2$	96
4.4.	Synthese von Protohämin-dipentachlorphenylester, $[FePP(OPCP)_2]Cl^-$	96
4.5.	Synthese von POE_{10000}-Gly-Hämin-His-OMe	97
5.	Synthese von histidinhaltigen Tripeptiden	99
5.1.	Anfärbereagenzien für Dünnschichtchromatographie	99
5.2.	Synthese des Histidin-Peptids (H-Leu-His-Ala-OH)	99
5.2.1.	Azid-Verfahren	99
5.2.2.	DCCI-Methode ausgehend von der N-terminalen Aminosäure	100
5.2.3.	DCCI-Methode ausgehend von der C-terminalen Aminosäure	104

6. Präparative Methode für UV-spektroskopischen Untersuchungen 108

C. ZUSAMMENFASSUNG 110

D. LITERATURVERZEICHNIS 111

ABKÜRZUNGEN

BAL	Benzyliden
CD	Circulardichroismus
Em	Normalredoxpotential
FePP, FeP	Protoporphyrin-Eisen-Komplex (Protohäm)
Fp.	Schmelzpunkt
ε	Molarer Extinktionskoeffizient ($M^{-1}cm^{-1}$)
Hb	Hämoglobin
HRP	Peroxidase aus Meerrettich
HOBt	1-Hydroxybenztriazol
L, B,	Ligand
λ	Wellenlänge
Mb	Myoglobin
NMR	Kernmagnetische Resonanz
POE	Polyoxyethylen
pK_{Im}	Dissoziationskonstante der Imidazolgruppe
S	Spinzahl
SDS	Dodecylsulfat
TfaOH	Trifluoressigsäure
TPO	Trypthophan-Dioxygenase

Die Abkürzungen der Aminosäuren und der Schutzgruppen für Peptidsynthesen entsprechen den Regeln der IUPAC (Biochemistry 11, 1726 (1972)).

A. ALLGEMEINER TEIL

1. Struktur-Funktion-Beziehung bei Hämoglobin und Myoglobin

1.1. Molekulare Strukturen des Hämo- und Myoglobins

Die molekularen Strukturen des Hämoglobins (Hb) und Myoglobins (Mb) wurden von den Arbeitsgruppen um PERUTZ [1] und KENDREW [2] durch Röntgenstrukturanalyse eingehend untersucht. Das aktive Zentrum dieser Moleküle ist das Protohämin bzw. Häm b (Abbildung 1). Es besteht aus einem Eisenatom, das von vier Stickstoffatomen des Porphyrinrings koordinativ gebunden ist.

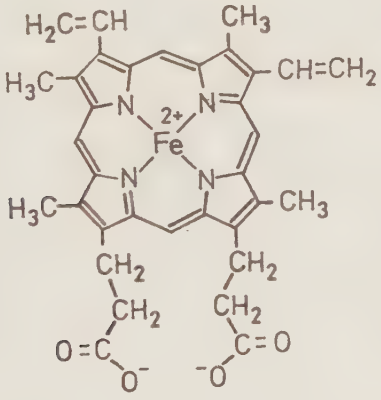


Abb. 1: Protohäm bzw. Häm b, das aktive Zentrum des des Hämoglobins (Hb) und Myoglobins (Mb)

Die fünfte Koordinationsstelle des Eisenatoms (proximale Seite des Häms) ist mit dem Stickstoffatom eines Histidin-

restes aus dem Polypeptidanteil (His F8) besetzt. Ebenso befindet sich an der sechsten Koordinationsstelle (distale Seite des Häms) ein Histidinrest (His E7), der allerdings für eine engere Bindung zu weit entfernt ist, so daß an dieser Seite die Bindung von Sauerstoff erfolgen kann. Die funktionelle Häm-Gruppe des Hb und Mb liegt als 5-fach-koordinierter, paramagnetischer High-spin Ferro-Komplex (desoxyHb und desoxyMb) vor. Beim desoxyMb liegt das Eisenatom ungefähr 0.03 nm außerhalb der Porphyrin-ebene auf der Seite des proximalen Histidins [3], wogegen sich beim desoxyHb das Eisenatom 0.075 nm außerhalb der Porphyrinebene befindet [4]. Durch die Bindung eines Sauer-stoff-Moleküls an die distale Seite des Häms geht die Ferro-Form in einen diamagnetischen Low-spin-Komplex über. Dabei wird das Eisenatom in die Ebene des Porphyrin-rings bewegt [5] (Abbildung 2).

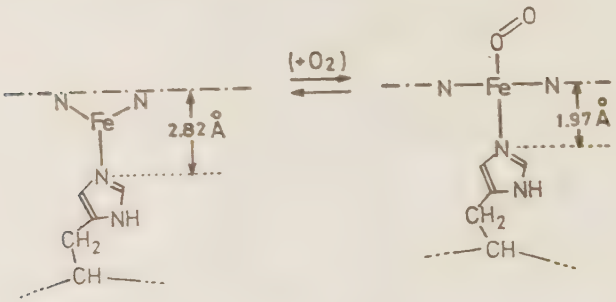


Abb. 2: Schematische Darstellung des O_2-Bindungszentrums in Hämoglobin

Das Myoglobin des Pottwals enthält 153 Aminosäuren (Molekulargewicht 16 700), die in acht α-Helixsegmenten angeordnet sind. Im Unterschied zum Mb liegen beim Hb Tetra-

mere vor, da jede einzelne Polypeptid-Kette eine Häm-Gruppe enthält. Das Hb A, hauptsächlich vorkommender Hämoglobintyp bei Erwachsenen, besteht aus je zwei identischen α-Ketten (141 Aminosäuren) und β-Ketten (146 Aminosäuren). Die vier Untereinheiten lagern sich tetragonal zu einem globularen Molekül zusammen. Obwohl die Primärstrukturen des Mb und Hb unterschiedlich sind, ist die dreidimensionale Anordnung der α- und β-Ketten denen des Mb sehr ähnlich. Die Umgebung des aktiven Zentrums der β-Kette des Hb wird in Abbildung 3 dargestellt.

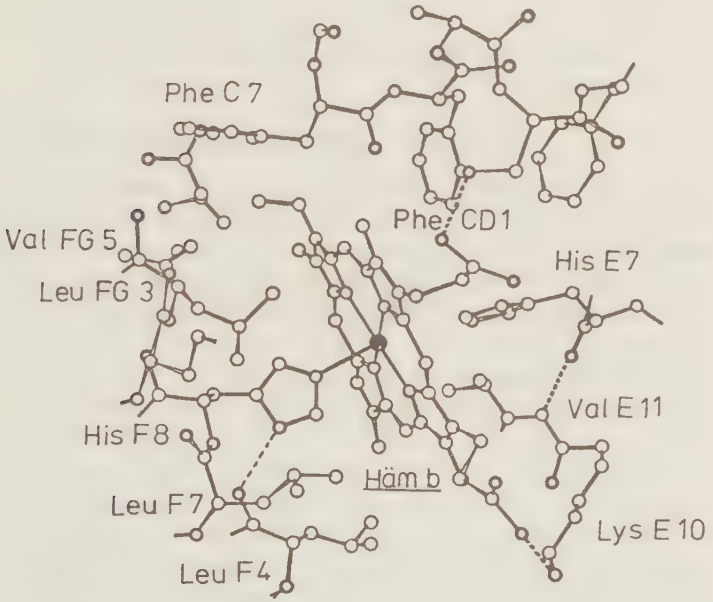


Abb. 3: Schematische Darstellung der Umgebung des aktiven Zentrums bei Hämoglobin (β-Kette)

Die Häm-Gruppe wird in einer Falte zwischen E- und F-Helixsegmenten koordinativ gebunden, wobei ihre zwei polaren Propionat-Seiten-Ketten zur Molekülоberfläche orientiert sind. Der Porphyrinrest des Häms ist im Innern des Moleküls eingebettet, wo er mit Ausnahme zweier Histidinreste von zahlreichen Aminosäureresten umgeben ist, die den stark hydrophoben Charakter der gesamten "Häm-Tasche" bewirken. Auf der distalen Seite befindet sich ein Histidin-(His E7), ein Valin-(Val E11) und ein Phenylalaninrest(Phe CD1) in der Nähe des Porphyrinrings, so daß die O_2-Bindungsstelle sterisch abgeschirmt wird.

1.2. Reversible Oxygenierung des Hämoglobins und Myoglobins

1.2.1. MO-Diagramm der Oxo-Form des Eisen-Porphyrins

In der Oxo-Form des Hb und Mb (oxyHb und oxyMb) ist eines der beiden Sauerstoffatome mit dem Eisenatom direkt verknüpft, wobei der Winkel zwischen der Porphyrinebene und der Achse des Sauerstoff-Moleküls etwa 120° beträgt [7,8]. Das MO-Diagramm der O_2-Bindung an das Eisenatom wird in Abbildung 4 dargestellt, wobei die Oxo-Form in einem quadratisch-pyramidalen Komplex angeordnet ist. Die acht Elektronen, die sich über die gesamten Molekülorbitale verteilen, ergeben eine $(xz,\pi^*)^2(z^2,\pi^*)^2(yz)^2(xy)^2$ Konfiguration. Dabei gibt es eine σ-Überlappung des Fe^{2+} d_z2-Orbitals mit einem O_2 π-Orbital und eine π-Überlappung des Fe^{2+} d_{xz} (oder d_{yz})-Orbitals mit dem anderen O_2 π-Orbital [9,10] (Abbildung 5). Da die Elektronenpaare der σ- und π-Bindung im Sinne von $Fe^{\delta+} - O_2^{\delta-}$ polarisiert sind, besitzt der am Eisenatom gebundene Sauerstoff einen superoxid-anionischen Charakter (Gleichung 1).

$$Fe^{2+}P + O_2 \rightleftharpoons [\,Fe^{2+}P\text{-}\bar{O}\text{=}\bar{\underline{O}} \longleftrightarrow Fe^{3+}P\text{-}\bar{\underline{O}}\text{-}\bar{\underline{O}}^{\ominus}\,] \quad (1)$$

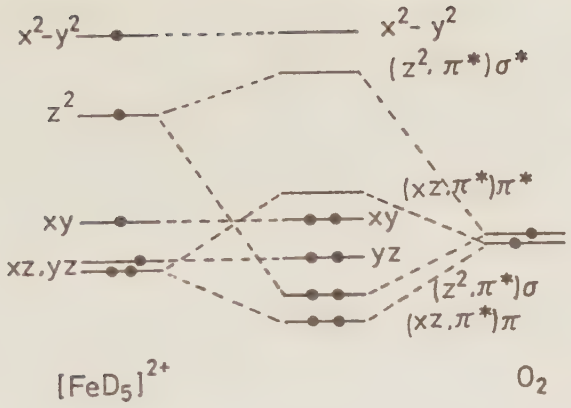


Abb. 4: MO-Diagramm des Fe^{2+}-O_2-Komplexes

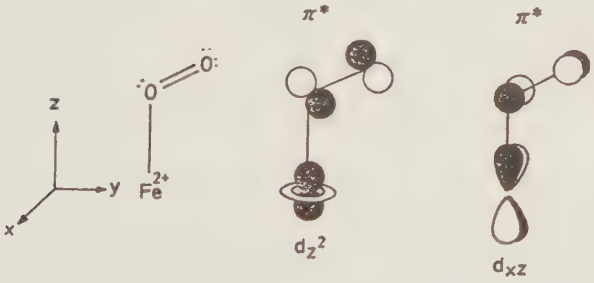


Abb. 5: σ- und π-Überlappung zwischen Fe^{2+} und O_2

Das MO-Energieschema des Imidazol-Eisen(II)-Porphyrin-O_2-Systemes wurde kürzlich nach der LCAO-Methode mit

Hückel'scher Näherung errechnet [11-13]. Es läßt die π-Backdonation-Bindung des proximalen Histidins mit dem Fe^{2+} d_{yz} (oder d_{xz})-Orbital erwarten, die eine wichtige Rolle für die Natur der Fe^{2+}-O_2-Bindung spielt [14]. Obwohl man die Reaktivität der Häm-Gruppe gegenüber Sauerstoff theoretisch derart formulieren kann, werden die biologischen Eigenschaften des Hb und Mb teilweise durch den umgebenden Polypeptidanteil bestimmt. Dies läßt sich wie folgt belegen:

a) In Wasser kann eine isolierte Häm-Gruppe ein Sauerstoff-Molekül nur für kurze Zeit binden, denn die Ferro-Form wird sehr schnell durch Oxidation in die Ferri-Form überführt, die keinen Sauerstoff mehr binden kann (s. 1.2.2.).

b) Ebenso wie das Hb und Mb besteht eine Anzahl von Hämproteinen aus einer Häm-Gruppe und umgebenden Polypeptidanteilen, jedoch unterscheiden sie sich von Hb und Mb in ihrer Reaktivität gegenüber Sauerstoff (s. 1.2.3.).

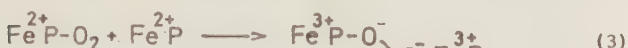
1.2.2. Stabilisierung der Fe^{2+}-O_2-Bindung bei Hämoglobin und Myoglobin

Der Polypeptidanteil des Hb und Mb stabilisiert die Fe^{2+}-O_2-Bindung durch folgende zwei Einflüsse:

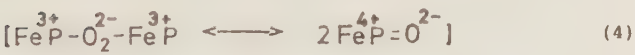
a) Der stark hydrophobe Charakter der "Häm-Tasche", die eine sehr niedrige dielektrische Konstante besitzt, erschwert einen Elektronenübergang vom Eisenatom zum Sauerstoff-Molekül, was zu einer Oxidation des Eisen(+2)-Atoms führen würde.

$$[Fe^{2+}P\text{-}O_2 \longleftrightarrow Fe^{3+}P\text{-}O_2^-] \xrightarrow{(H^+)} Fe^{3+}P + O_2^-(HO_2^\cdot) \qquad (2)$$

b) Die kugelförmige Polypeptid-Kette des Hb und Mb, die die einzelnen Häm-Gruppen tief im Innern des Moleküls einbettet, verhindert die Dimerisierung zweier Häm-Gruppen, wobei das entstehende peroxo-verbrückte Eisen(III)-Porphyrin spontan zum μ-oxo-Eisen(III)-Porphyrin übergehen würde (Gleichungen 3-5).



(3)



(4)

(5)

Diese Verhältnisse wurden von mehreren Untersuchungen an Modellsubstanzen für Hb und Mb bestätigt. Früher zeigte WANG [15], daß die ein Imidazol koordinierende Häm-Gruppe reversibel Sauerstoff binden kann, ohne selbst oxidiert zu werden, wenn man sie in eine Polystyrol-Matrix einbettet, wobei das Polystyrol das Häm mit einer ausgeprägt unpolaren Umgebung versieht (Abbildung 6).

Bei einigen niedermolekularen Eisen(II)-Porphyrin-Derivaten trat auch in organischen Lösungsmitteln eine reversible Oxygenierung auf, wenn durch großvolumige Substituenten am Eisen-Porphyrin die Dimerisierung zweier Eisen-Porphyrine vermieden werden konnte [16]. Ein elegantes Beispiel ist das "Picket-Fence"-Porphyrin von COLLMAN [17]. Bei diesem Tetraphenylporphyrin-Derivat wird durch die tert.-Butyl-Gruppen am Porphyrin eine unpolare Umgebung um die O_2-Bindungsstelle aufgebaut und die Dimerisierung mit einem weiteren Porphyrin blockiert. Daher bindet es in apolaren Lösungsmitteln bei Raumtemperatur ein Sauer-

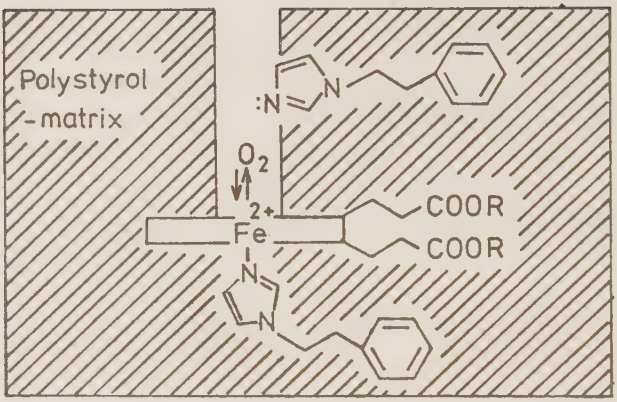


Abb. 6: Synthetisches Modellsystem für Hb und Mb nach WANG [15]

stoff-Molekül und der erhaltene Oxo-Komplex ist mehrere Stunden stabil (Abbildung 7).

Selbst das einfache Eisen(II)-Porphyrin kann bei Temperaturen unter -45°C in apolaren Lösungsmitteln den Sauerstoff-Komplex stabilisieren, wobei die Geschwindigkeit des Dimerisierungsprozesses (Gleichungen 3-5) stark abnimmt [18]. In einigen apolaren Lösungsmitteln wie Dimethylsulfoxid (DMSO) und Dimethylformamid (DMF) läßt sich der Fe^{2+}-O_2-Komplex durch Solvatation stabilisieren [19], was einer Dipol-Dipol-Wechselwirkung zwischen dem Sauerstoff und einem Lösungsmittelmolekül entspricht.

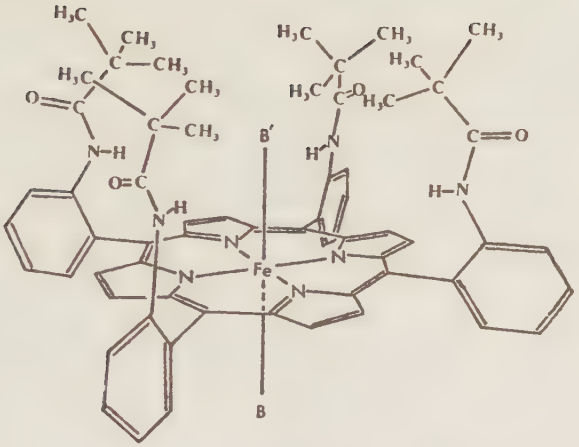


Abb. 7: "Picket-Fence"-Porphyrin nach COLLMAN [17]

Eine ähnliche Dipol-Dipol-Wechselwirkung des Oxo-Komplexes liegt auch im Hb und Mb vor, wo das distale Histidin (His E7) die Fe^{2+}-O_2-Bindung stabilisieren kann [20] (Abbildung 8). Jedoch ist die tatsächliche Rolle des distalen Histidins bei Hb und Mb noch unklar.

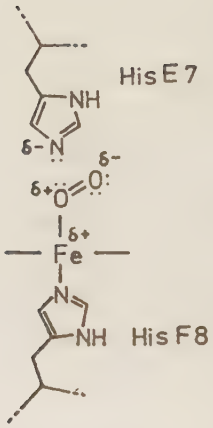


Abb. 8: Mögliche Dipol-Dipol-Wechselwirkung zwischen dem distalen Histidin und dem Oxo-Komplex des Hämoglobins und Myoglobins

1.2.3. Reaktivität von Hämproteinen gegenüber Sauerstoff

Einige natürliche Hämproteine und ihre biologische Funktion werden in Tabelle 1 zusammengestellt. Darunter sind nur wenige Hämproteine, die direkt mit Sauerstoff wechselwirken. Die Reaktion dieser Hämproteine mit Sauerstoff läßt sich nach drei Arten klassifizieren:

a) Sauerstoffübertragung: Hämoglobin (Hb) und Myoglobin (Mb)

b) Reduktion des Sauerstoffs zu Wasser: Cytochrom c-Oxidase

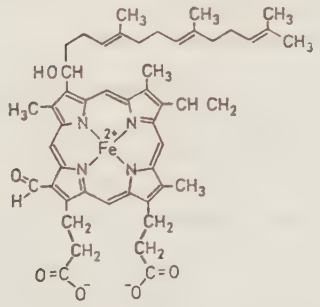
c) Katalytische Aktivierung des Sauerstoffs: Cytochrom P-450 und Tryptophan-Dioxygenase

Diese unterschiedliche Reaktivität der Hämproteine gegenüber Sauerstoff wurde von WILLIAMS [21] in Bezug auf das

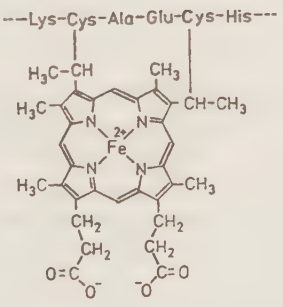
Tab. 1: Hämproteine und ihre biologische Funktion

Hämprotein	Funktion	Häm-Gruppe	Proximal-Seite
Hämoglobin (Hb)	O_2-Transport	Häm b	His
Myoglobin (Mb)	O_2-Speicherung	Häm b	His
Cytochrom b	Elektronenübergang	Häm b	His
Cytochrom c	Elektronenübergang	Häm c	His
Cytochrom c-Oxidase	O_2-Reduktion zu Wasser	Häm a + Cu	His(?)
Cytochrom P-450	Monooxygenase	Häm b	His
Peroxidase (HRP)+)	Oxidation von Substraten	Häm b	His
Katalase	H_2O_2-Dismutation	Häm b	-COOH (?)
Tryptophan-Dioxygenase (TPO)	O_2-Einsetzung in Substraten	Häm b	His

+) Peroxidase aus Meerrettich



Häm a



Häm c

Redoxpotential (Fe^{2+}/Fe^{3+}) diskutiert. Die meisten Hämproteine haben ein Redoxpotential zwischen +0.32 V und

-0.27 V bei pH 7.0 [22]. Dies ist von der Elektronegativität der am Häm koordinierten Liganden, von der Basizität des Porphyrinrings und von der Spin-Zahl des Eisenatoms abhängig (Abbildung 9).

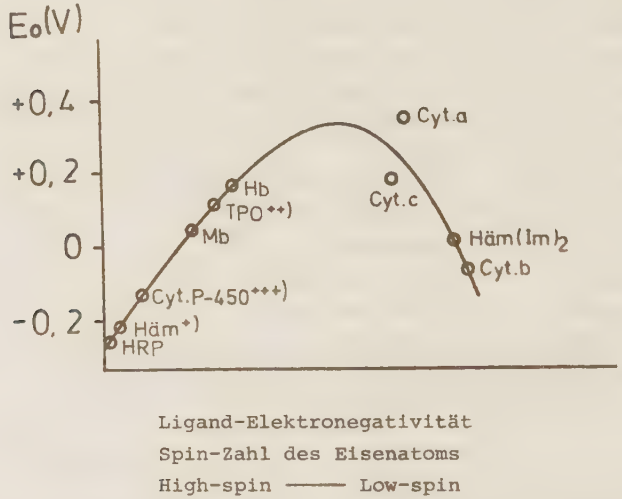


Abb. 9: Beziehung zwischen der Häm-Gruppe des Hämproteins und ihrem Redoxpotential [21]
*) Fe^{3+}/Fe^{2+}-Protoporphyrin IX bei pH 8.2
**) Tryptophan-Dioxygenase + Tryptophan [23]
***) Cytochrom P-450 + Campher [24]

Andererseits erklärte CASTRO [25] die Reaktivität des Hämproteins mit seiner bestimmten Raumstruktur um die Häm-Gruppe. Die von ihm vorgestellten Konformationsmodelle zeigten nur eine schlechte Übereinstimmung mit den natürlichen Hämproteinen, jedoch wurde die Funktion des proximalen Histidins bestätigt. Dabei verstärkt der π-Donor-

Charakter der Imidazol-Liganden die Überlappung der Orbitale des Eisenatoms mit denen des Sauerstoff-Moleküls, was zu einer Stabilisierung des Oxo-Komplexes führt.

In neuester Zeit schlug VALENTINE [26] vor, daß die Reaktivität eines Hämproteins gegenüber Sauerstoff vom proximalen Histidinrest bestimmt wird. Es handelt sich dabei um eine Wasserstoffbrücken-Bindung am zweiten Stickstoffatom des Imidazolrings des proximalen Histidinrestes. Das Gegen-Element der Wasserstoffbrücke im Hämprotein wurde durch spektroskopischen Untersuchungen nachgewiesen; dabei handelt es sich z.B. um ein Carbonyl-Sauerstoffatom der Peptid-Hauptkette (Leu F4) beim Hb und Mb [27] und um ein Wasser-Molekül bei der Peroxidase aus Meerrettich (HRP) [28] (Abbildung 10).

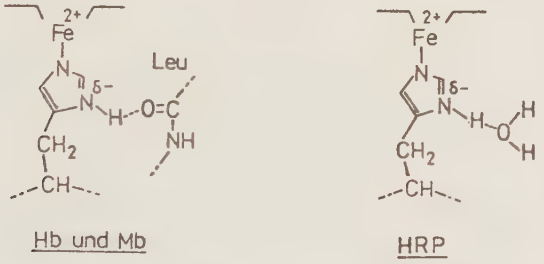


Abb. 10: Schematische Darstellung der Wasserstoffbrücken-Bindung bei den wichtigen Hämproteinen

Dadurch wird also die Basizität und die Aromatizität des Imidazolrings bestimmt, die schließlich dem Eisenatom des Häms eine bestimmte Reaktivität gegenüber Sauerstoff verleiht. Ein interessantes Beispiel stellt die α-Kette des Hb dar, da sich ihre Affinität gegenüber Sauerstoff durch

die Spaltung der Wasserstoffbrücken-Bindung am proximalen Histidin erhöhen kann [29] (Abbildung 11). Diese Konfigurationsänderung am aktiven Zentrum der α-Kette spielt für das kooperative Sauerstoff-Bindungsverhalten des Hb eine wesentliche Rolle (s. 1.3.).

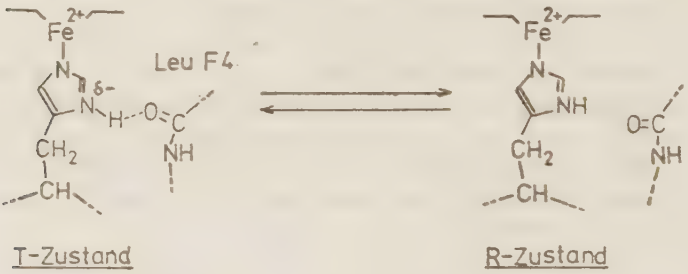


Abb. 11: O_2-Affinitätsänderung durch die Bildung der Wasserstoffbrücken-Bindung bei der α-Kette des Hämoglobins

1.3. Funktionelle Unterschiede zwischen Hämoglobin und Myoglobin

Die Bindung eines Sauerstoff-Moleküls am Mb und an jede Untereinheit des Hb zeigt sich als eine einfache eins zu eins Assoziation und kann anhand einer Gleichgewichtsreaktion beschrieben werden (Gleichung 6).

$$Mb + O_2 \rightleftharpoons^{K_{O_2}} MbO_2 \qquad (6)$$

$$\log \frac{Y}{1 - Y} = \log P_{O_2} + \log K_{O_2} \qquad (7)$$

Die Sauerstoff-Bindungskurve hat eine hyperbolische Gestalt (Abbildung 12), wobei $P_{1/2}$ (der Sauerstoff-Partialdruck in Torr, in Gleichung 7 bei Y = 0.5) bei unterschiedlichen Myoglobinen zwischen 0.4 und 0.7 mm Hg liegt.

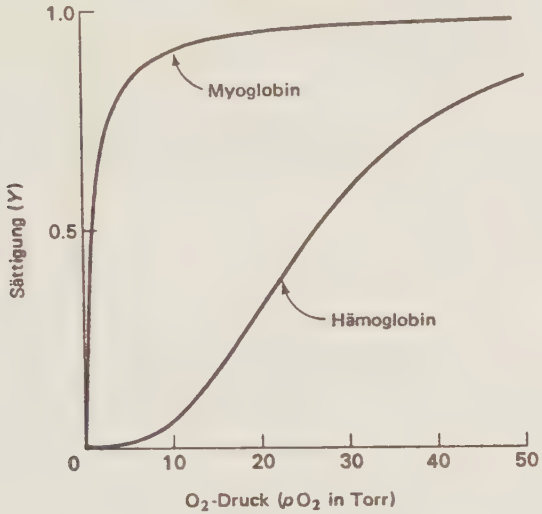


Abb. 12: Sauerstoff-Bindungskurve des Hämoglobins und Myoglobins

Dagegen verläuft die Sauerstoff-Bindung des Hb sigmoid (Abbildung 12), was eine Voraussetzung für die physiologische Funktion des Hb im Blut ist. Die Gleichgewichtskonstante des Hb wird empirisch nach der Hill'schen Gleichung 9 dargestellt, wobei P_{O_2} in Gleichung 7 durch $P_{O_2}^n$ ersetzt wird.

$$Hb + n\,O_2 \rightleftharpoons^{K_{O_2}} Hb(O_2)_n \qquad (8)$$

$$\log \frac{Y}{1 - Y} = n \log P_{O_2} + \log K_{O_2} \qquad (9)$$

P_{O_2} : Sauerstoff-Partialdruck

Y : Grad der O_2-Sättigung

n : Hill'sche Konstante

Die Hill'sche Konstante des Hb beträgt 2.8 und trägt der kooperativen Sauerstoff-Bindungsverhalten Rechnung. Dadurch wird die Effektivität des Sauerstoff-Transports beim Hb wesentlich gesteigert.

PERUTZ zeigte darüber hinaus [4], daß das kooperative Sauerstoff-Bindungsverhalten des Hb von der Wechselwirkung zwischen seinen α- und β-Untereinheiten herrührt (sogenannte Ham-Ham-Wechselwirkung). Dabei ruft die strukturelle Änderung innerhalb einer α-Untereinheit infolge der Bindung eines Sauerstoff-Moleküls strukturelle Änderungen an den Kontaktbereichen der Untereinheiten hervor, die weiter die O_2-Bindungseigenschaften aller vier Untereinheiten beeinflussen. Diese allosterischen Änderung im Hb gehen wesentlich auf eine konformative Änderung der Häm-Gruppe zurück. Es handelt sich dabei um eine kleine Verschiebung des Eisenatoms beim Oxygenierungsprozeß in die Porphyrinebene hinein und einer anschließenden Schwächung der Wasserstoffbrücken-Bindung beim proximalen Histidin (Abbildung 13; s.a. Abbildungen 2 und 11).

Beim Hb findet man zwei weitere wichtige Sauerstoff-Bindungsverhalten:

a. Die O_2-Affinität des Hb ist pH-abhängig und wird durch die Kohlenmonoxid (CO_2)-Konzentration beeinflusst (Bohr-Effekt) [30]

b) Die O_2-Affinität des Hb wird auch durch organisches Phosphat wie Diphosphoglycerat (DPG) reguliert (DPG-Effekt) [31]

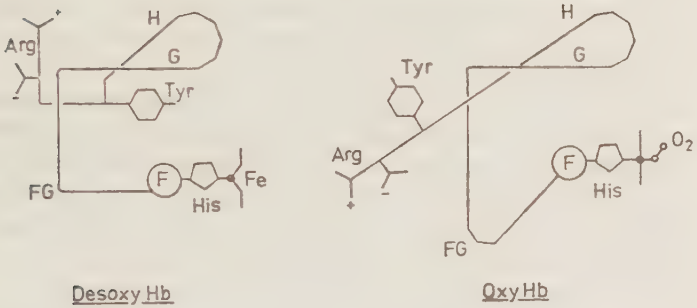


Abb. 13: Schematische Darstellung der Konformationsänderung einer Untereinheit im Hb bei der Bildung des O_2-Komplexes [4]

Beide Effekte spielen im Hb nicht nur für den O_2- und CO_2-Transport im Blut, sondern auch für die Umweltanpassung des Hb eine wichtige Rolle [32].

Zusätzlich kann das Hb und Mb auch andere Moleküle binden. Von toxikologischer Bedeutung ist die Bindung des Kohlenmonoxids (CO) und Stickstoffmonoxids (NO), wobei die Affinität in der Reihenfolge NO CO O_2 abnimmt. Die Affinität des Hb für CO ist etwa 200mal höher als die für O_2 [33].

2. Untersuchungen der "Hämpolymer"-Modellsubstanzen für Hämoglobin und Myoglobin

2.1. Die "Hämpolymer"-Modellsubstanzen

In biologischen Systemen ist Wasser nicht nur Lösungsmittel für Naturstoffe, sondern bestimmt auch durch seine chemischen und physikalischen Eigenschaften ihre biologische Funktion. Deshalb ist es für das Verständnis der Biofunktion des Hb und Mb sinnvoll, wasserlösliche Eisen-Porphyrin-Derivate zu synthetisieren und ihre Reaktivität gegenüber Sauerstoff in wässrigem Medien zu prüfen. Dabei können die Forderungen an eine Modellsubstanz für Hb und Mb folgendermaßen zusammengefaßt werden:

a) Das Eisen-Porphyrin-Derivat soll in Wasser löslich oder solubilisierbar sein.

b) Es soll in monomerem Zustand existieren, wobei eine Dimerisierung mit anderem Eisen-Porphyrin vermieden werden muß.

c) Seine Ferro-Form soll als 5-fach-koordinierter-paramagnetischer High-spin-Komplex vorliegen.

d) Die Umgebung der distalen Seite des Eisen-Porphyrins soll sehr hydrophob sein.

In den letzten Jahren wurden von BAYER u. Mitarb. [34-37] sogenannte "Hämpolymer"-Modellsubstanzen für Hb und Mb synthetisiert und ihre reversible Oxygenierbarkeit in wässrigen Medien untersucht. Bei diesen Verbindungen ist das aktive Zentrum des Hb und Mb (Protohämin) an ein wasserlösliches Polymerpeptid gebunden. Dabei ähneln die Modellsubstanzen in ihren molekularen Strukturen der Umgebung der Häm-Gruppe im Hb und Mb (Abbildung 14). Diese "Hämpolymer"-Modellsubstanzen haben im allgemeinen folgende chemische und physikalische Eigenschaften:

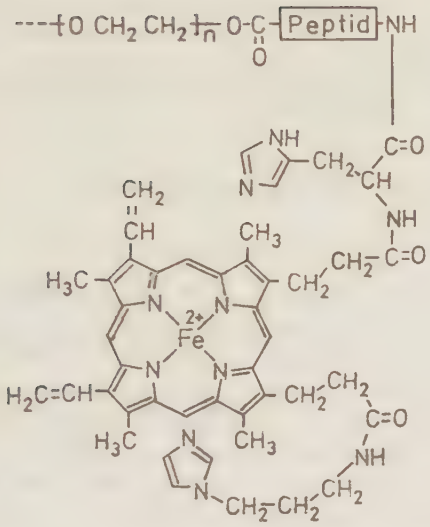


Abb. 14: Schematische Darstellung der "Hämpolymer"-Modellsubstanzen nach BAYER [34-37]

a) Ihre Ferro - Form liegt bei pH 7 als 6-fach-koordinierter Low-spin-Komplex vor.
b) Unter niedrigen Sauerstoff-Partialdrucken zeigt das UV-Spektrum ihrer Ferro-Form eine Blauverschiebung.
c) Diese Blauverschiebung ist reversibel: dabei zeigt das UV-Spektrum unter Stickstoff bzw. im Vakuum teilweise wieder die Ferro-Form.
d) Die Stabilität des intermediären Sauerstoff-Komplexes ist jedoch gering: dabei wird der Sauerstoff-Komplex unter höheren Sauerstoff-Partialdrucken bis zur Ferri-Form oxidiert.

In diesem Kapitel werden weitere Untersuchungen der neuen Reihe von "Hämpolymer"-Modellsubstanzen vorgestellt: dabei wurde der proximale Ligand (N-substituiertes Imidazol) durch einen Histidinrest des Peptids ausgetauscht.

2.2. Strategie der "Hämpolymer"-Synthese

2.2.1. Synthese des histidinhaltigen POE-Peptids

Für die Einführung des Histidinrestes als proximalen Liganden bei "Hämpolymer"-Modellsubstanzen wurde zuerst das histidinhaltige POE-Peptid (POE = Polyoxyethylen) synthetisiert. Die Aminosäuresequenz des Peptidanteils war Ala-His-Lys-Leu-Gly, die einer Teilsequenz der α-Kette des Hb(F9-FG3) ähnelt und deren Lysinrest die Möglichkeit bietet, eine Häm-Gruppe über die ε-Amino-Gruppe kovalent an das Peptidpolymer zu binden.

Diese Aminosäuresequenz wurde durch die Liquid-Phase-Peptid-Synthese [38] ausgehend von POE-Glycin stufenweise synthetisiert. Die Synthese-Methode wird schematisch in Abbildung 15 dargestellt und der Syntheseverlauf und die Ausbeute laut Aminosäureanalyse werden in Tabelle 2 zusammengefaßt. Eine weitere Kupplung des POE-Peptids mit Boc-His(Trt)-OH, das dem Histidinrest (His F8) in der α-Kette des Hb entspricht, ergab eine unbefriedigende Ausbeute (46 %: s. 3.2.1.).

Die Abspaltung der N_{ε}-Boc- und N_{Im}-Trt-Gruppe aus dem POE-Peptid, [Z-Ala-His(Trt)-Lys(Boc)-Leu-Gly-POE_{5000}]$_2$, kann mit TfaOH/CH_2Cl_2 (1:1) erreicht werden: dabei sind die N_{α}-Z-Gruppen unter den Reaktionsbedingungen stabil.

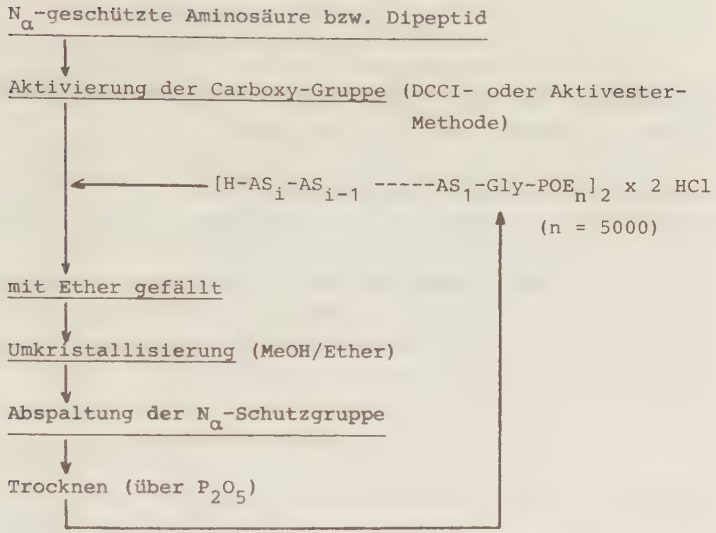


Abb. 15: Schematische Darstellung der Liquid-Phase-Peptid-Synthese [38]

Tab. 2: Syntheseverlauf und Ausbeute für das POE-Peptid

Aminosäure-Derivat	Kupplungs-Methode	Reaktions-Zeit (Tage)	Ausbeute (%)
Boc-Gly-OH[+)]	DCCI-Anhydrid	4	96.4
Boc-Leu-OH	-OPCP[++)]	2	96.0
Z-Lys(Boc)-OH	DCCI	2	100.0
Z-Ala-His(Trt)-OH	DCCI/HOBt	2	84.7

POE: Molekulargewicht 10000, Solvens CH_2Cl_2
Base: N-Methylmorpholin,
[+)] 4-Dimethylaminopyridin (Überschuß der Carboxy-Komponente: 5-fach)
[++)] -OPCP = Pentachlorphenylester

2.2.2. Synthese der "Hämpolymer"-Modellsubstanzen

Die Kupplung des Protohämins mit einem POE-Peptid und einer niedermolekularen Amino-Komponente an die beiden Propionat-Gruppen des Porphyrins wurde über Pentachlorphenyl-Aktivester durchgeführt. Der durch eine Veresterung von Protohämin mit Trichloracetylpentachlorphenylester in DMF hergestellte Protohämindipentachlorphenylester, $[FePP(OPCP)_2]Cl^2$, reagiert mit der Amino-Gruppe des POE-Peptids und ergibt vorzugsweise ein monosubstituiertes Häminpolymer. Anschliessend setzt man das erhaltene Häminpolymer mit überschüssiger niedermolekularer Amino-Komponente zur gewünschten disubstituierten "Hämpolymer"-Modellsubstanz um (Gleichungen 10-13).

$$Cl_3CCOCl + HOC_6Cl_5 \xrightarrow{\text{(Pyridin)}} Cl_3CCOOC_6Cl_5 + HCl \qquad (10)$$

$$[Fe^{3+}PP(COOH)_2]Cl^- + 2\ Cl_3CCOOC_6Cl_5 \xrightarrow{\text{(TEA/DMF)}}$$

$$[Fe^{3+}PP(COOC_6Cl_5)_2]Cl^- + 2\ Cl_3CCOOH \qquad (11)$$

$$[Fe^{3+}PP(COOC_6Cl_5)_2]Cl^- + R_1\text{-}NH_2 \longrightarrow$$

$$[Fe^{3+}PP(CONHR_1)(COOC_6Cl_5)]Cl^- + C_6Cl_5OH \qquad (12)$$

$$[Fe^{3+}PP(CONHR_1)(COOC_6Cl_5)]Cl^- + R_2\text{-}NH_2 \longrightarrow$$

$$[Fe^{3+}PP(CONHR_1)(CONHR_2)]Cl^- + C_6Cl_5OH \qquad (13)$$

Die während des Reaktionsverlaufs entstehenden niedermolekularen Nebenprodukte und die nicht umgesetzte Amino-Komponente können von der "Hämpolymer"-Modellsubstanz durch Gelfiltration leicht getrennt werden. Als Solventien für die Kupplung sind nicht nur organische Lösungsmittel ($CHCl_3$, CH_2Cl_2, Essigester, DMF, Dioxan), sondern auch wässrige Medien wie etwa DMF/Wasser und Dioxan/Wasser verwendbar [101].

Die Ergebnisse der Synthese der "Hämpolymer"-Modellsubstanzen werden in Tabelle 3 zusammengestellt.

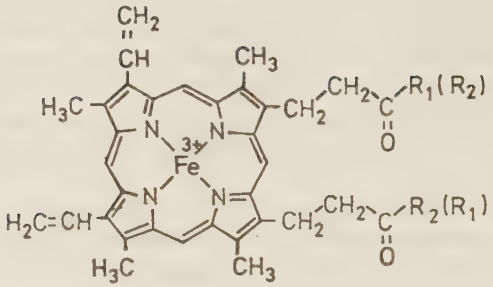
Tab. 3: Ausbeute und Hämingehalt der "Hämpolymer"-Modellsubstanzen

Verbindung (Nr.)	R_1	R_2	Ausbeute[+] (%)	Hämingehalt[++]
1	-Gly-POE	-Gly-OMe	46.8	13.4
2	-Gly-POE	-His-OMe	47.3	14.1
3	-Gly-POE	-Val-His-OMe	55.4	15.3
4	-Lys-Leu-Gly-POE | His-Ala-Z	-Gly-OMe	19.5	4.1
5	-Lys-Leu-Gly-POE | His-Ala-Z	-His-OMe	20.4	4.9

[+] % des eingesetzten Hämin-Derivats an das POE-Peptid

[++] (mol/g x 10^{-5}): wurde von der Absorption des Dipyridin-Ferro-Komplexes bestimmt (β-Bande: ϵ = 13800)

POE = Polyoxyethylen (Molekulargewicht 10000)



2.3. Aggregation der "Hämpolymer"-Modellsubstanzen in Wasser

Es ist bekannt, daß Eisen(III)-Protoporphyrin IX (Protohämin) leicht in Wasser aggregiert [39]. Diese Eigenschaft ist in neutralen bzw. alkalischen wässrigen Lösungen besonders stark: dabei entsteht als Hauptprodukt das durch ein Sauerstoffatom verbrückte μ-oxo-Eisen(III)-Porpphyrin, von dem zwei molekulare Strukturen nachgewiesen wurden [40]. Trotz längerer Polymer-kette kann eine Aggregation der "Hämpolymer"-Modellsubstanzen in wässrigen Medien nicht verhindert werden. Die Änderung der UV-Spektren des Hämpolymers [1] bei pH-Steigerungen wird in Abbildung 16 dargestellt. Bei einer pH-Erhöhung von 2.5 bis 7.0 nimmt die Extinktion der Soret-Bande (395 nm) ab. Dabei wird das Eisen(III)-Porphyrin durch eine Koordination des Hydroxyl-Ions von monomeren High-spin-Komplex zum μ-oxo-Dimer umgewandelt (Gleichungen 14-16). Eine weitere pH-Erhöhung (> pH 8) führt zu einer konformativen Änderung des μ-oxo-Dimers. Dabei wird das asymmetrische μ-oxo-Dimer durch die Bindung eines oder zweier Hydroxyl-Ionen zum symmetrischen μ-oxo-Dimer umgewandelt (Gleichung 16).

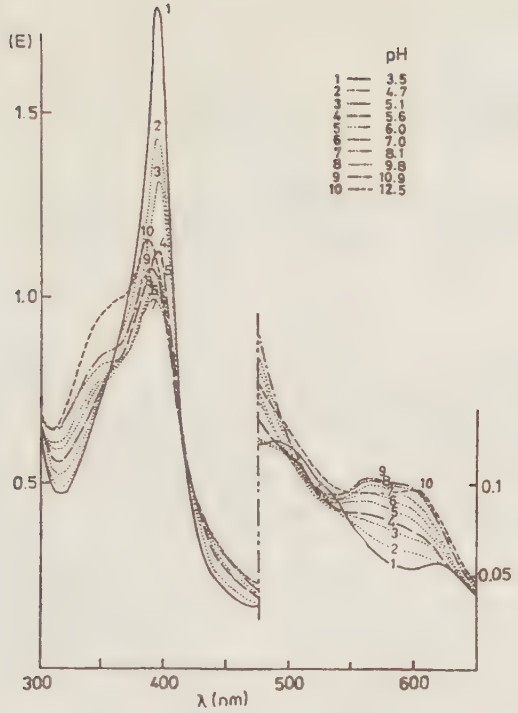
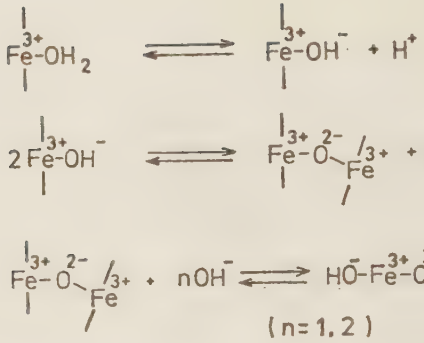


Abb. 16: Änderung des UV-Spektrums beim Hämpolymer (1) in Abhängigkeit von der pH-Erhöhung

Hämpolymer (1) = POE_{10000}-Gly-Hämin-Gly-OMe,

$[Fe^{3+}]$ = 0.015 mM



(14)

(15)

(16)

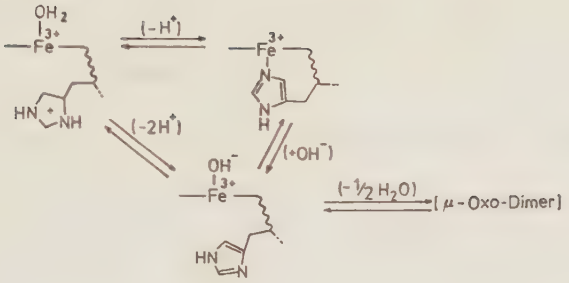
Probenvorbereitung:

10 ml Häminpolymer-Lösung (0.03 mM) in 0.01 N HCl wird mit 0.1 N NaOH auf einen bestimmten pH-Wert eingestellt und mit Wasser auf 20 ml verdünnt. Das UV-Spektrum wurde 30 Min. nach der Probenvorbereitung aufgenommen.

pH	Soret-Bande (nm)	Q-Bande (nm)
2.5	395 (135)	495, 527, 618
7.0	387 (58)	568, 603
12.5	380 (67)	612

( ): Extinktionskoeffizient x 10^{-3}

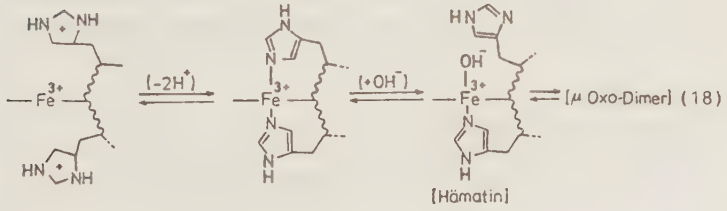
Die Änderung der UV-Spektren der Hämpolymere (2), (3) und (4) bei pH-Erhöhung ähnelt dem Fall des Hämpolymers (1): dabei ist die Koordination des Histidinrestes am Eisen(+3)-Porphyrin nur zwischen pH 5-7 möglich. Bei einer weiteren pH-Steigerung bzw. bei einer höheren Konzentration des Hydroxyl-Ions wird der am Eisen(III)-Porphyrin koordinierte Imidazol-Ligand gegen ein Hydroxyl-Ion ausgetauscht, wobei der entstehende Hydroxy-Komplex bis zum μ-oxo-Eisen(III)-Dimer stabilisiert (Gleichung 17).



(17)

Dieses Verhalten der Hämpolymere wird mit der Änderung der Extinktion der Soret-Bande (395 nm) bei pH-Erhöhung in Abbildung 17 zusammengestellt.

Dagegen liegt das Hämpolymer (5) zwischen pH 6.5-7.5 als 6-fach-koordinierter, Low-spin-Ferri-Komplex vor, in dem die zwei Histidinreste des Peptidanteils am Eisen(III)-Porphyrin koordinativ gebunden sind, wobei sich die Soret-Bande von 395 nm nach 408 nm verschiebt. Bei einer weiteren pH-Erhöhung wird jedoch der Low-spin-Komplex durch den Austausch der Imidazol-Liganden mit einem Hydroxyl-Ion bis zum μ-oxo-Eisen(III)-Dimer stabilisiert: dabei wird das Spektrum des Hämatins bei Hb und Mb (Soret-Bande: 411-412 nm) nicht beobachtet (Gleichung 18). Die Änderung von Extinktion der Soret-Bande (408 nm) des Hämpolymers (5) bei pH-Erhöhung wird nochmals in Abbildung 17 dargestellt.



(18)

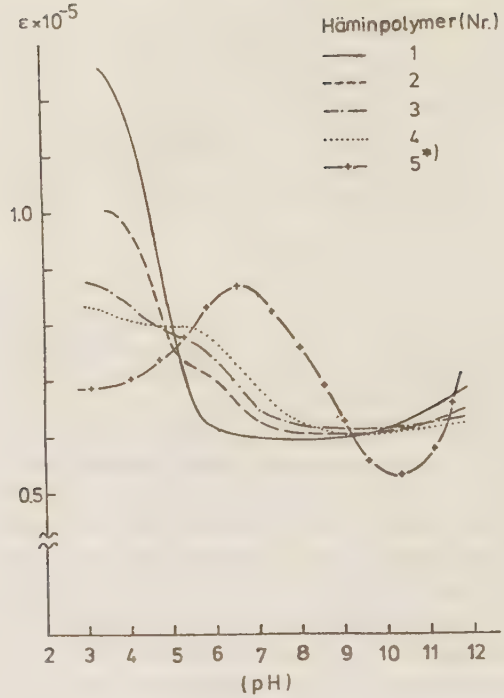


Abb. 17: Änderung von Extinktion der Soret-Bande bei den Hämpolymeren in Abhängigkeit von pH-Erhöhung
$[Fe^{3+}]$ = 0.01 mMol, ε = molarer Extinktionskoeffizient ($M^{-1}cm^{-1}$) bei 395 nm, *) bei 408 nm

Probenvorbereitung:
10 ml Hämpolymer-Lösung (0.02 mM) in 0.1 M KH_2PO_4 wird mit 1 N NaOH bzw. 0.1 N HCl auf einen bestimmten pH-Wert

eingestellt und mit Wasser auf 20 ml verdünnt. Das UV-Spektrum wurde 30 Min. nach Probenvorbereitung aufgenommen.

2.4. Ferro-Komplexe der "Hämpolymer"-Modellsubstanzen

Die UV-Spektren der Ferro-Form der "Hämpolymer"-Modellsubstanzen bei pH 7.2 werden in Abbildung 18 dargestellt. Das Hämpolymer (1) liegt als 4-fach-koordinierter, intermediärer Spin-Zustand (S = 1) vor, wogegen die Hämpolymere (2) und (3) größtenteils als 5-fach-koordinierte, High-spin (S = 2)-Komplexe vorliegen, in denen der Histidinrest des Peptidanteils am Eisen(II)-Porphyrin koordinativ gebunden ist. Dabei ist jedoch in diesen UV-Spektren der Extinktion der Soret-Bande schwächer als bei den Spektren des Hb und Mb (s. Abbildung 22 und Tabelle 6). Das Hämpolymer (5) liegt als 6-fach-koordinierter, Low-spin (S = 0)-Komplex vor, in dem die beiden Histidinreste des Peptidanteils die proximale bzw. distale Seite des Häms besetzen. Obwohl das Spektrum des Hämpolymers (4) auch dem Spektrum des 6-fach-koordinierten, Low-sin (S = 0)-Komplexes ähnelt, nimmt die Extinktion der Soret- und Q-Bande etwa 10-20 % gegenüber dem Hämpolymer (5) ab. Dabei hat das Hämpolymer (4) nur einen Histidinrest in dem Peptidanteil.

Alle Ferro-Formen der "Hämpolymer"-Modellsubstanzen können sich bei Zusatz von CO in Fe^{2+}-CO - Komplexe umwandeln. Die Daten der UV-Spektren der Ferro-Form und des CO-Komplexes werden in Tabelle 4 zusammengefaßt und die UV-Spektren des Hämpolymers (1) werden in Abbildung 19 dargestellt.

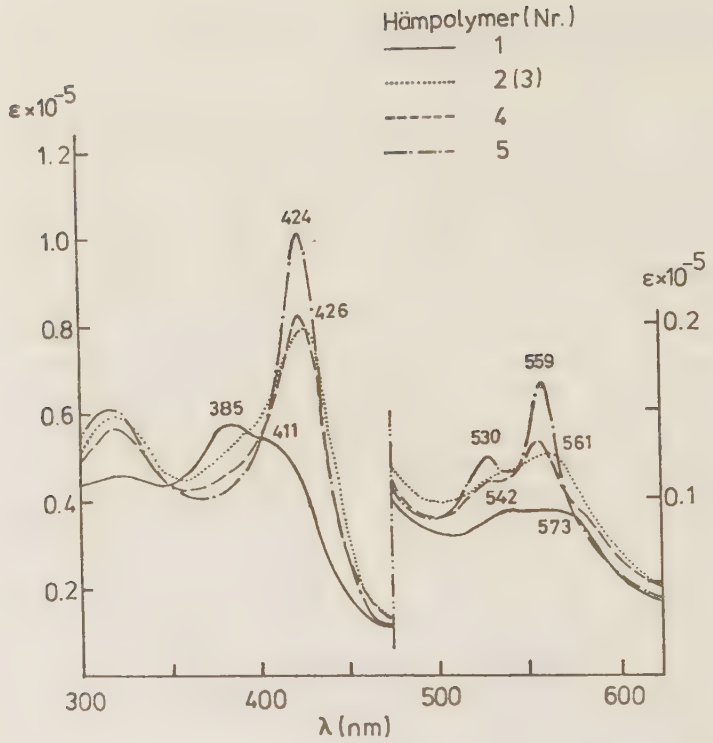


Abb. 18: UV-Spektren der Ferro-Form von "Hämpolymer"-Modellsubstanzen bei pH 7.2
$[Fe^{2+}]$ = 0.01 mM, Phosphat-Puffer 0.5 M
Reduktant: Natriumdithionit in 0.01 N NaOH

Die Probenvorbereitung wird im Experimentellen Teil, Kapitel 6 beschrieben.

Tab. 4: UV-Spektren von Hämpolymeren bei pH 7.2

Hämpolymer (Nr.)	Fe^{2+}			Fe^{2+}-CO		
1	385, 410 (57) (51)	542, 573 (6.8) (6.9)		407 (110)	533, 565 (11.5) (14.0)	
2	426 (78)	530, 561 (8.3) (10.3)		410 (155)	532, 558 (11.8) (11.4)	
3	425 (73)	530, 562 (8.2) (10.4)		411 (167)	533, 560 (11.1) (11.6)	
4	423 (81)	527, 555 (9.8) (12.1)		414 (143)	536, 565 (14.7) (10.9)	
5	424 (112)	530, 559 (8.0) (14.3)		415 (187)	536, 565 (15.1) (14.0)	

( ): Molarer Extinktionskoeffizient (x 10^{-3}: $M^{-1}cm^{-1}$)

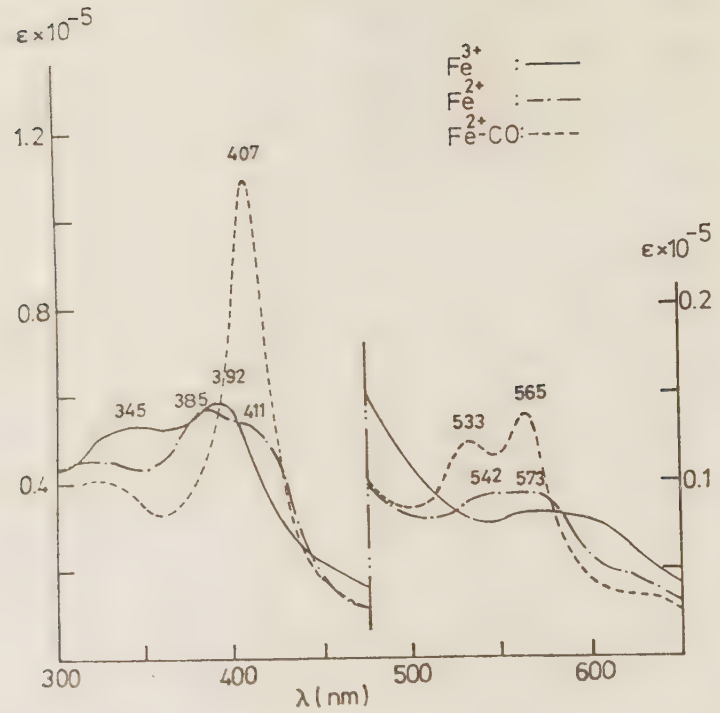


Abb. 19: UV-Spektrum von Hämpolymer (1) bei pH 7.2

	Soret-Bande (nm)	Q-Bande (nm)
Fe^{3+}	345(51), 392(58)	568(6.5), 603(6.5)
Fe^{2+}	385(57), 410(51)	542(6.8), 573(6.9)
Fe^{2+}-CO	407(110)	533(11.5),565(14.0)

( ): Extinktionskoeffizient (x 10^{-3}, $M^{-1}cm^{-1}$), $[Fe^{2+}]$ = 10^{-5} M

Die Probenvorbereitung wird im Experimentellen Teil im Kapitel 6 beschrieben.

2.5. Reaktivität der "Hämpolymer"-Modellsubstanzen gegenüber Sauerstoff und Kohlenmonoxid

Bei den Hämpolymeren (1), (2), (3) und (4) wird die Ferro-Form unter Zusatz von Sauerstoff sehr schnell bis zur Ferri-Form oxidiert, so daß das Spektrum des intermediären Sauerstoff-Komplexes nicht beobachtet wird. Dagegen ähnelt die Reaktivität des Hämpolymers (5) gegenüber Sauerstoff den früher vorgestellten "Hämpolymer"-Modellsubstanzen in Abbildung 14 [34-37]. Dabei zeigt das Ferro-Spektrum des Hämpolymers (5) bei Einleitung einer geringen Menge Sauerstoff (O_2-Partialdruck unter 10 mm Hg) eine Blauverschiebung bei der Soret- und Q-Bande (Abbildung 20). Das intermediäre Spektrum ändert sich längere Zeit nicht, wenn man die Lösung unbewegt hält. Andererseits wird das intermediäre Spektrum durch Schütteln der Lösung oder durch eine weitere Zugabe von Sauerstoff leicht bis zur Ferri-Form oxidiert. Da man dieses intermediäre Spektrum nur im ruhigen Zustand beobachten kann, ist die Untersuchung der reversiblen Spektrumsänderung zu der Ferro-Form nicht durchführbar.

Ein Zusatz von überschüssigem Reduktionsmittel (5-10 fache Menge an Natriumdithionit für das Eisen-Porphyrin) ändert diese Blauverschiebung nicht. Dabei nimmt jedoch die Extinktion des Eisen-Porphyrins um etwa 5-10 % ab.

Obwohl der CO-Komplex aller "Hämpolymer"-Modellsubstanzen in CO- bzw. N_2-Atmosphäre längere Zeit sehr stabil ist, wird er bei Einleitung von Sauerstoff langsam bis zur Ferri-Form oxidiert.

Der Oxidationsprozeß des CO-Komplexes beim Hämpolymer (5) unter Zugabe von Sauerstoff wird in Abbildung 21 dargestellt. Es wird dabei das UV-Spektrum des CO-Komplexes mit vier isosbestischen Punkten zur Ferri-Form umgewandelt. Die Stabilität des CO-

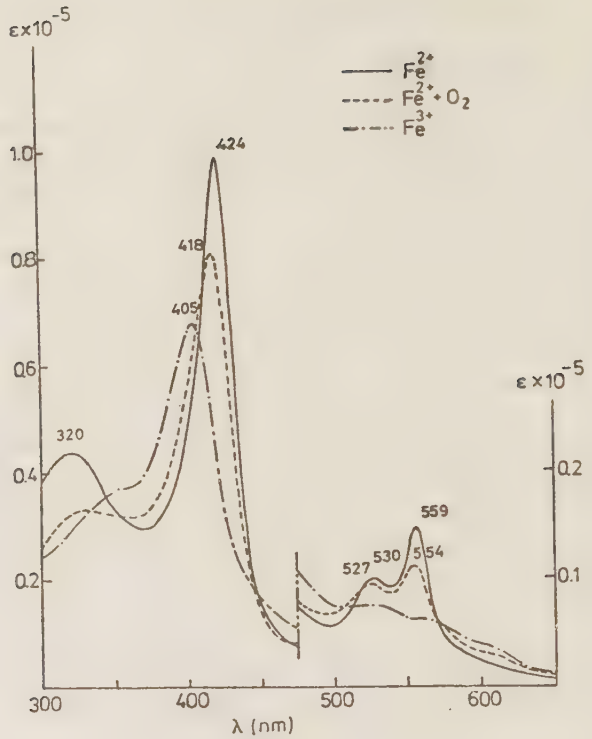


Abb. 20: Spektrumsänderung des Hämpolymers (5) bei Zusatz von Sauerstoff bei pH 7.2
$[Fe^{2+}]$ = 0.01 mM, 0.05 M Phosphat-Puffer bei pH 7.2, 25°C
---: unter Zusatz von 2 ml O_2 (P_{O_2} = etwa 10 mm Hg)

	Soret-Bande (nm)	Q-Bande (nm)
Fe^{2+}	424(112)	530(8.0), 559(14.3)
$Fe^{2+} + O_2$	418(80)	527(7.8), 554(10.5)
Fe^{3+}	405(68)	

( ): Extinktionskoeffizient (x 10^{-3})

Komplexes gegenüber Sauerstoff nimmt in der Reihenfolge der Hämpolymere (5) > (4) > (3) > (2) > (1) ab.

Mit der gleichen Methode wurde die Reaktivität des Hb gegenüber Sauerstoff und Kohlenmonoxid geprüft (Abbildung 22). Dabei zeigt das UV-Spektrum des Sauerstoff-Komplexes im Gegensatz zum Hämpolymer (5) eine starke Rotverschiebung bei der Q-Bande und die Spektrumsänderungen unter den O_2-, CO- und Ferro-Komplexen sind jeweils durch Einleitung von O_2-, CO- bzw. N_2-Gasen miteinander reversibel.

Auf diese Weise unterscheiden sich die "Hämpolymer"-Modellsubstanzen vom Mb und Hb in ihrer Reaktivität gegenüber Sauerstoff und Kohlenmonoxid. Eher kann man ihr Reaktionsverhalten mit dem der Peroxidasen vergleichen.

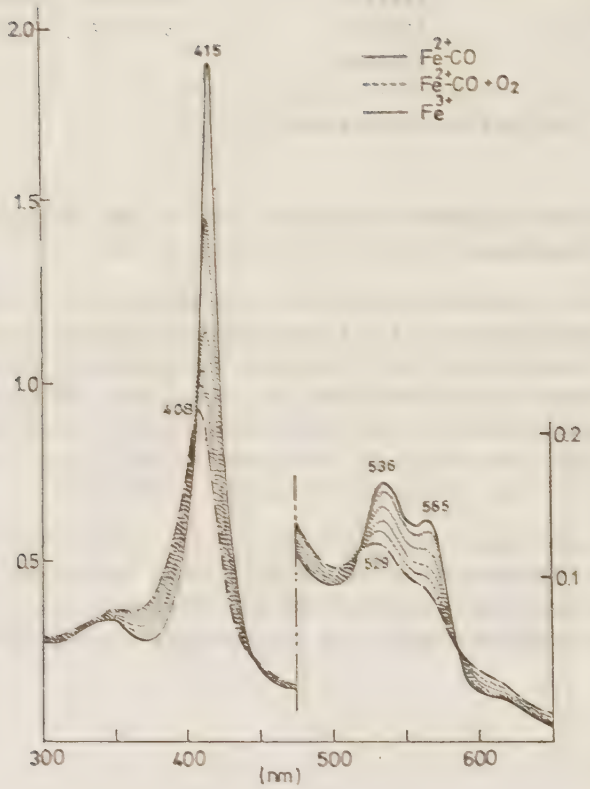


Abb. 21: Oxidation des CO-Komplexes beim Hämpolymer (5) unter Zugabe von Sauerstoff
$[Fe^{2+}]$ = 0.01 mM, 0.05 M Phosphat-Puffer pH 7.2 bei 25°C

———— : P_{CO} = 1 atm

------- : unter Zugabe von je 2 ml O_2 (P_{O_2} = etwa 10, 20, 30 und 40 mm Hg entsprechen)

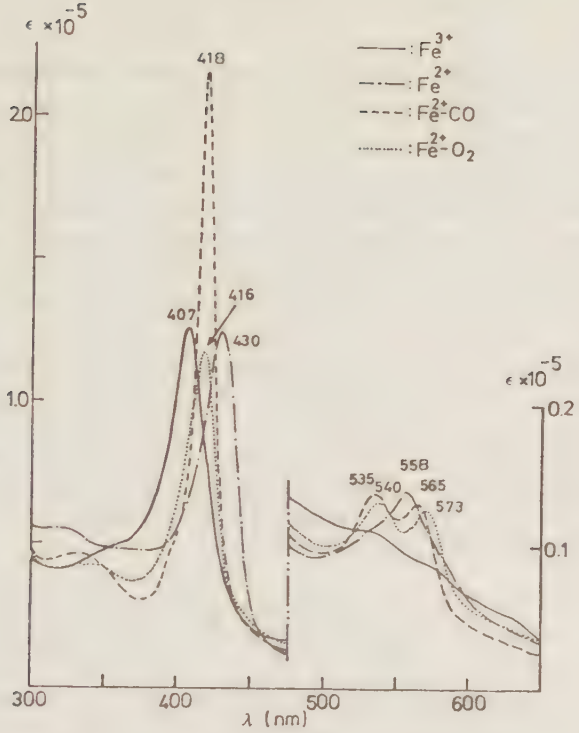


Abb. 22: UV-Spektren des Hämoglobins (Hb) bei pH 7.2
[Hb] = 0.008 mM in 0.5 M Phosphat-Puffer bei 25°C

	Soret-Bande (nm)	Q-Bande (nm)	
Fe^{3+}	407(129)		
Fe^{2+}	430(125)	558(14.0)	
Fe^{2+}-CO	418(215)	535(13.7)	565(13.0)
Fe^{2+}-O_2	416(117)	540(13.1)	573(12.6)

( ): Extinktionskoeffizient (x 10^3)

2.6. Reaktionsmechanismen der "Hämpolymer"-Modellsubstanzen

2.6.1. Funktionelle Unterschiede zwischen Myoglobin und Peroxidase aus Meerrettich

Ebenso wie Hb und Mb bestehen die Peroxidasen, wie etwa die Cytochrom-c Peroxidase und die Peroxidase aus Meerrettich (HRP) aus einer Häm-Gruppe, die von einem Histidinrest (proximales Histidin) aus dem Peptidanteil koordinativ gebunden ist, wobei die Ferro-Form (Ferro-Peroxidase) auch als 5-fach-koordinierter, paramagnetischer High-spin-Komplex vorliegt. Die biologische Bedeutung der Peroxidase ist die katalytische Oxidation verschiedenartiger Substrate durch eine Aktivierung des Hydroperoxids (H_2O_2). Dabei wurden die fünf Oxidationszustände der Peroxidase nachgewiesen [41]. Diese Oxidationszustände der Peroxidase und ihr Reaktionsverhalten werden in Abbildung 23 dargestellt.

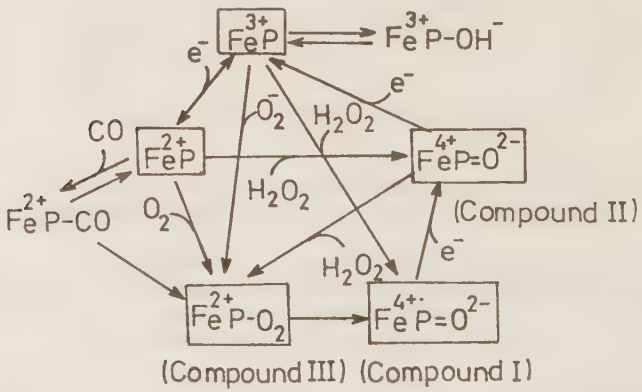


Abb. 23: Oxidationszustände und Reaktionsverhalten der Peroxidase (HRP) nach YAMAZAKI [42]

Obwohl die Peroxidase wie Mb ein Sauerstoff-Molekül koordinativ binden kann, unterscheiden sie sich vom Mb in ihrer Reaktivität gegenüber Sauerstoff wie folgt:

a) Die Reaktionsgeschwindigkeit der Ferro-Peroxidase gegenüber Sauerstoff ist etwa 500 mal geringer als die des Mb. [k_{O_2} (HRP) = 5.8 x 10^4 $M^{-1}sec^{-1}$, k_{O_2} (Mb) = 1.4 x 10^7 $M^{-1}sec^{-1}$ [43,44]]

b) Der Sauerstoff-Komplex der Peroxidase (Oxo-Peroxidase bzw. Compound III) ist sehr instabil. Der Sauerstoff-Komplex wird in wenigen Minuten spontan bis zur Ferri-Form oxidiert [Halbwertzeit: 4 Min. bei 25°C [44]].

c) Die Bindung des Sauerstoff-Moleküls an die Häm-Gruppe ist bei der Peroxidase irreversibel [44].

d) Der am Eisen(II)-Porphyrin koordinierte Sauerstoff wirkt bei der Peroxidase als Oxidans und der Sauerstoff-Komplex der Peroxidase kann verschiedenartige Substrate, wie etwa Anilin-, Phenol- oder Indol-Derivate oxidieren [45].

Andererseits ist es merkwürdig, daß der Ferryl-oxo-Komplex (Compound II) infolge der geschwindigkeitsbestimmenden Stufe der Reaktion (Reduktion des Ferryl-oxo-Komplexes zur Ferri-Form) in den gesamten Reaktionskreisen [46] als überwiegendes Produkt entstehen kann, obwohl dieser höhere Oxidationszustand des Eisenatoms normalerweise sehr instabil ist. Es wird vermutet, daß der am Eisen-Porphyrin koordinierte Histidinrest den Ferryl-oxo-Komplex stabilisieren kann [47].

Die UV-Spektren der Peroxidase (HRP) werden im Vergleich zum Mb in Tabelle 6 zusammengestellt, wobei die UV-Spektren mit Ausnahme von Ferryl-Komplexen denen des Mb ähneln.

Tab. 6: Daten der UV-Spektren der HRP und Mb [48,49]

Komplex	HRP			Mb		
Fe^{3+}	403 (91)	409 (10.0)	641.5 (2.8)	407 (144)	502 (8.7)	633 (3.4)
Fe^{3+}-OH^-	412 (98)	540 (9.0)	585 (8.8)	416 (88)	545 (8.6)	574.5 (6.8)
Fe^{2+}	440 (75)	558 (11.2)	595 (5.2)	434 (114)	556 (12.0)	
Fe^{2+}-O_2	417 (97)	545 (8.7)	573 (6.9)	418 (128)	543 (13.7)	581 (14.6)
Fe^{2+}-CO	423 (137)	542 (11.8)	573 (11.4)	424 (187)	540 (14.0)	579 (12.2)
Fe^{4+}=O^{2-}	418 (77)	527 (8.1)	555 (7.4)	(unbekannt)		

2.6.2. Ferryl-oxo-Komplex als intermediärer Sauerstoff-Komplex

Aufgrund der Ähnlichkeit seines UV-Spektrums und seiner Reaktivität mit der Peroxidase (HRP) kann man das intermediäre Spektrum des Hämpolymers (5) in Abbildung 20 als UV-Spektrum des Ferryl-oxo-Komplexes (Compound II) interpretieren. Wenn man die experimentellen Bedingungen für die UV-spektroskopischen Messungen bedenkt, kann der Ferryl-oxo-Komplex des Hämpolymers (5) prinzipiell nach zwei Reaktionsmechanismen verlaufen:

a) Teilnahme von Hydroperoxid (H_2O_2) an den Reaktionskreisen

Die Reaktionskreise des Eisen-Porphyrins in Bezug auf die Peroxidase werden nochmals in Abbildung 24 schematisch dargestellt, wobei jeder Reaktionsverlauf durch die Buchstaben A-K, und Reaktionen, an denen Hydroperoxid und ein Reduktionsmittel beteiligt sind mit dicken bzw. punktierten Linien, dargestellt werden.

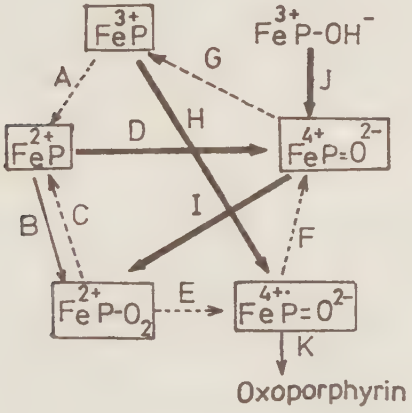
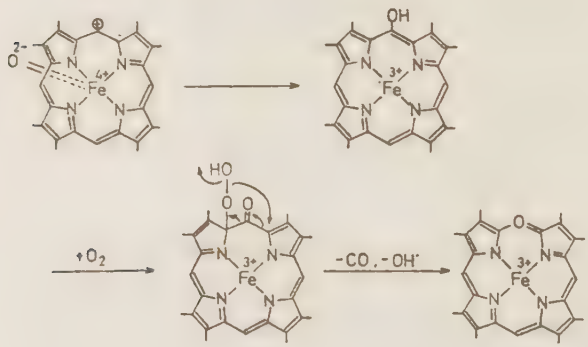


Abb. 24: Reaktionskreise des Eisen-Porphyrins
——— : Reaktion an der H_2O_2 beteiligt ist
----- : Reaktion an der ein Reduktionsmittel beteiligt ist

Dabei reagiert die Ferro-Form des Hämpolymers (5) mit equimolarer Menge Hydroperoxid (Reaktion D) und wandelt sich zum Ferryl-oxo-Komplex um. Da die Reaktion G eine geschwindigkeitsbestimmende Stufe in den gesamten Reaktions-

kreisen ist [46], entsteht der Ferryl-oxo-Komplex als Hauptprodukt, wenn in diesem System kein Reduktionsmittel bzw. Proton-Donor vorkommt.

Bei Zusatz von überschüssigem Reduktionsmittel kann der Ferryl-oxo-Komplex zur Ferri-Form reduziert werden, die weiter durch die Reaktionswege A und D zum Ferryl-oxo-Komplex zurückgehen kann. Dabei ist jedoch die Reaktion H auch möglich, in die der als Zwischenprodukt entstehende Ferri-Komplex mit einem Hydroperoxid zum instabilen Ferryl-Kation-Radikal (Compound I) reagiert, das unter der Wirkung von Sauerstoff bis zum Oxo-Porphyrin-Komplex oxidiert wird (Gleichung (19) [50]). Dabei wird eine Abnahme der Extinktion des Eisen-Porphyrins beobachtet.



Diese vielseitigen möglichen Konkurrenzreaktionen des Eisen-Porphyrins machen es schwierig, eine reversible Oxygenierbarkeit der Eisen-Porphyrin-Derivate in wässrigen Medien zu prüfen. Obwohl diese Untersuchungen ohne Zusatz von Hydroperoxid durchgeführt wurden, konnte eine Bildung von Hydroperoxid durch eine Oxidation des reduzierenden Dithionit-Ions mit einer Spure von

Sauerstoff nicht ausgeschlossen werden. Das Dithionit-ion bzw. SO_2^--Radikal reagiert dabei mit einem Sauerstoff-Molekül und anschließend wird das erhaltene Superoxid-Anion (O_2^-) bis zum Hydroperoxid reduziert (Gleichungen 20-22 [51]).

$$S_2O_4^{2-} \rightleftharpoons 2\ SO_2^- \qquad (20)$$

$$SO_2^- + O_2 \xrightarrow{K_{O_2}} SO_2 + O_2^- \qquad (21)$$

$$2\ H^+ + O_2^- \longrightarrow H_2O_2 + O_2 \qquad (22)$$

$$(K_{O_2} = 1.3 \times 10^6\ M^{-1}sec^{-1})$$

b) Dimerisierung des Sauerstoff-Komplexes mit dem Eisen(II)-Porphyrin

Die Oxidation des Sauerstoff-Komplexes durch eine Dimerisierung zweier Häm-Gruppen wird in Kapitel 1.2.2. vorgestellt, wobei auch der Ferryl-oxo-Komplex als Zwischenprodukt entstehen kann. Man kann diese Reaktionsmechanismen (Gleichungen 3-5) leicht so verstehen, daß dieser Oxidationsprozeß mit einer unvollständigen Sauerstoff-Bindung der Eisen(II)-Porphyrine beschleunigt wird. Dieses Oxidationsverhalten des Eisen(II)-Porphyrin-O_2-Komplexes wurde von ANTONINI et al. [52] durch die Untersuchungen der Oxidation der Oxo-Peroxidase bestätigt. Es ergibt sich eine Mischung von Ferro-Peroxidase mit einer sauerstoffhaltigen Lösung, die eine höhere Oxidationsgeschwindigkeit des Ferro-Peroxidase zeigt, als bei dem Fall der rein isolierten Oxo-Peroxidase. Die kinetische Rechnung dieses Oxidationsprozesses zeigte, daß die vollständige Oxidation des Sauerstoff-Komplexes bei dem molaren

Verhältnis $[Fe^{2+}\text{-}O_2]$: $[Fe^{2+}]$ = 1 : 3 erreicht wird, das den Reaktionen E, F und G in Abbildung 24 entspricht. Dabei wirkt das Eisen(II)-Porphyrin selbst reduzierend.

Damit kann die "Hämpolymer"-Modellsubstanz auch unter einem niedrigen O_2-Partialdruck zum Ferryl-oxo-Komplex umgewandelt werden.

Interessant ist, daß trotz des Peptidanteils der Peroxidase eine Wechselwirkung zwischen zwei Häm-Gruppen nicht verhindert wird. Die distale Seite der Häm-Gruppe ist bei den Peroxidasen im Gegensatz zum Mb und Hb von den polaren Aminosäureresten umgeben [53].

2.6.3. Oxidation des CO-Komplexes bei den "Hämpolymer"-Modellsubstanzen

Die Oxidation des CO-Komplexes bei den "Hämpolymer"-Modellsubstanzen rührt von einer Dissoziation des Kohlenmonoxids aus dem Ferro-CO-Komplex durch Photolyse her. Es kann dabei das am Eisen(II)-Porphyrin koordinierte Kohlenmonoxid an Licht langsam dissoziert werden, wogegen der am Eisen(II)-Porphyrin koordinierte Sauerstoff keine oder wenige solcher Eigenschaften besitzt. Deshalb wirkt der Sauerstoff gegenüber Ferro-CO-Komplexen als "trapping reagent " (CO-Fänger) [54], d.h. daß bei dem Austausch des Kohlenmonoxids mit einem Sauerstoff-Molekül als Ligand des Eisen(II)-Porphyrins der erhaltene Sauerstoff-Komplex bis zur Ferri-Form spontan oxidiert wird, wenn der Sauerstoff-Komplex wie bei den Peroxidasen sehr instabil ist. Da eine Einleitung von Sauerstoff außerhalb des Messgerätes durchgeführt werden mußte, konnte das Kohlenmonoxid in Abhängigkeit von der Belichtungszeit aus den "Hämpolymer"-Modellsubstanzen dissozieren. Ausgehend von diesen Untersuchungen kann man feststellen, daß der als Zwischenprodukt entstehende Sauerstoff-Komplex der

"Hämpolymer"-Modellsubstanzen genauso wie der der Peroxidase instabil ist.

2.7. Redoxpotential der "Hämpolymer"-Modellsubstanzen

Das Redoxpotential des Ferri- / Ferro-Systems der "Hämpolymer"-Modellsubstanzen wurde mit Hilfe von Redoxindikatoren qualitativ bestimmt. Dabei kann die Gleichgewichtsreaktion des Redox-Systems zwischen der "Hämpolymer"-Modellsubstanz und einem Redoxindikator anhand der Nernstischen Gleichung folgendermaßen beschrieben werden.

$$Em' - Em = \frac{RT}{2F} \log \frac{[\text{oxid. Indikator}]\,[Fe^{2+}]^2}{[\text{red. Indikator}]\,[Fe^{3+}]^2} \qquad (23)$$

Em´	=	Normalredoxpotential eines Redoxindikators
Em	=	Normalredoxpotential des Hämpolymers
T	=	absolute Temperatur (^{O}K)
R	=	Gaskonstante
F	=	Faradaykonstante

Da die meisten Redoxindikatoren in der oxidierten Form leuchtend gefärbt und in der reduzierten Form farblos sind, kann man mit UV-spektroskopischen Methoden in einer verdünnten Lösung das Redoxpontential der "Hämpolymer"-Modellsubstanzen qualitativ bestimmen. Es müssen jedoch folgende Bedingungen erfüllt werden [55]:

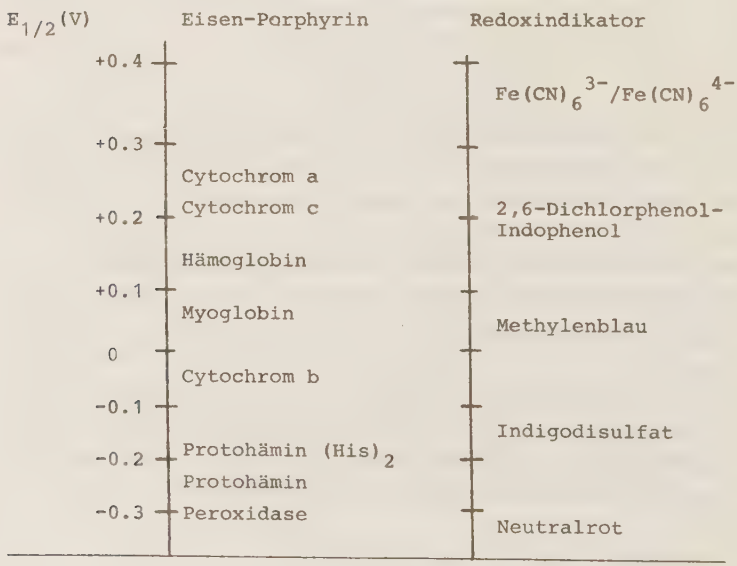
a) Das Redox-System des Indikators soll reversibel sein.
b) Das Normalredoxpotential und die Farbänderung des Indikators sind pH- und Temperatur-abhängig, deshalb sollen der pH-Wert und die Temperatur der Lösung unter definierten Bedingungen gehalten werden.

c) Als Indikator darf keine gegenüber dem Eisen-Porphyrin spezifische Reaktivität zeigender Substanz verwendet werden, da der Gleichgewichtszustand gestört wird. Am Eisen-Porphyrin kommen eine koordinative Bindung des Indikators oder eine Bildung des Elektronendonor-Akzeptor-Komplexes in Frage. Ein solches Verhalten wurde bei einer Mischung von Indigodisulfat mit einigen Hämpolymeren beobachtet.

d) Die Geschwindigkeit der Redox-Reaktion der "Hämpolymer"-Modellsubstanzen soll genauso schnell verlaufen wie bei dem Redoxindikator, wodurch ein ständiger Gleichgewichtszustand erreicht wird.

Die Redoxpotentiale (Fe^{3+}/Fe^{2+}) einiger natürlicher und künstlicher Eisen-Porphyrin-Systeme und einiger gebräuchlicher Redoxindikatoren sind in Tabellle 7 zusammengestellt.

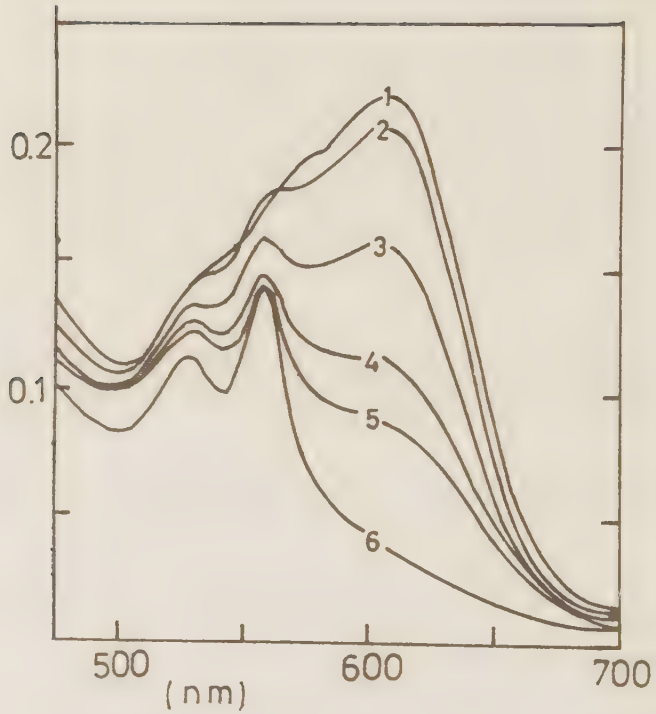
Tab. 7: Em-Wert einiger Eisen-Porphyrin-Systemen und Redoxindikatoren bei pH 7.0 und 25°C



Da man das Redoxpotential der "Hämpolymer"-Modellsubstanzen zwischen etwa +0.15 V und -0.3 V erwartet, wurden für ihre Redoxpotentialbestimmungen drei Redoxindikatoren gewählt: Methylenblau (Em = +0.01 V), Indigodisulfat (Em = -0.125 V) und Neutralrot (Em = -0.325 V).

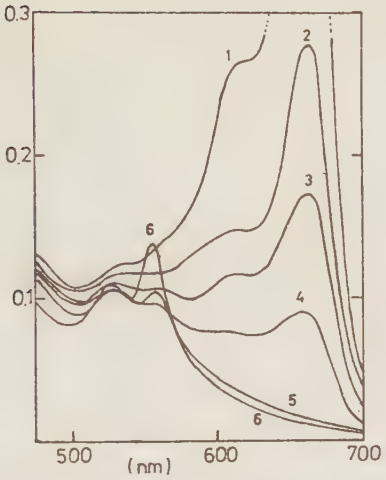
Die Änderungen der UV-Spektren einiger Mischungen des Hämpolymers (5) mit dem obengenannten Redoxindikator durch Titration mit Natriumdithionit werden in Abbildung 25 (A-C) dargestellt. Bei kontinuierlicher Zugabe von Natriumdithionit wird zuerst Methylenblau vorzugsweise reduziert, wogegen bei Neutralrot zuerst Reduktion des Eisen-Porphyrings erfolgt. Damit liegt das Redoxpotential des Hämpolymers (5) zwischen -0.05 V und -0.25 V. Anschließend konnte das Redoxpotential durch Vergleich der Extinktion der Soret- und Q-Bande des Eisen-Porphyrins und der Extinktion des Indigodisulfat (bei 604 nm) zu etwa -160 mV bestimmt werden. Diese Redoxpotentialbestimmungsmethode wird schematisch in Abbildung 26 wiedergegeben.

Die anderen Hämpolymere (1), (2), (3) und (4) liegen in ihrer Ferri-Form als μ-Oxo-dimer vor. Mit der gleichen Tritrationsmethode kann mit Methylenblau und Neutralrot das Redoxpotential dieser Hämpolymere etwa zwischen -0.2 V und -0.24 V eingestuft werden. Bei Anwesenheit von Indigodisulfat zeigte sich jedoch eine spezifische Änderung der UV-Spektren, wobei unter Zugabe von Reduktionsmittel das UV-Spektrum des Eisen-Porphyrins zuerst einen noch bislang unbekannten Verlauf nimmt (Soret-Bande 370 nm). Bei weiterer Zugabe von Reduktionsmittel verschiebt sich das UV-Spektrum etwa 5-6 nm ins Rote. Dieses Verhalten wird besonders bei dem Hämpolymer (1) deutlich.

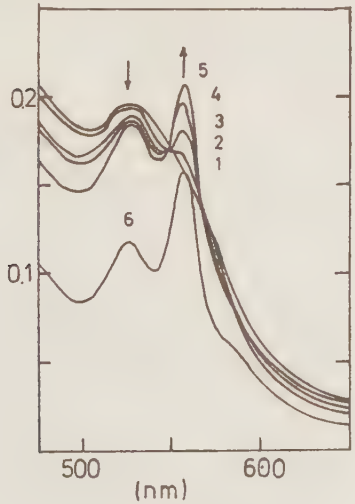


(A) Hämpolymer (5) mit Indigodisulfat

Abb. 25: Änderung der UV-Spektren einer Mischung des Hämpolymers (5) mit einem Indikator durch Titration mit Natriumdithionit [Hämpolymer] = 8 x 10^{-6} M, [Redoxindikator] = 8 x 10^{-6} M, Reduktionsmittel Natriumdithionit in 0.01 N NaOH, pH 7 bei 25°C



(B) Hämpolymer (5) mit Methylenblau



(C) Hämpolymer (5) mit Neutralrot

Fortsetzung der Abbildung 25

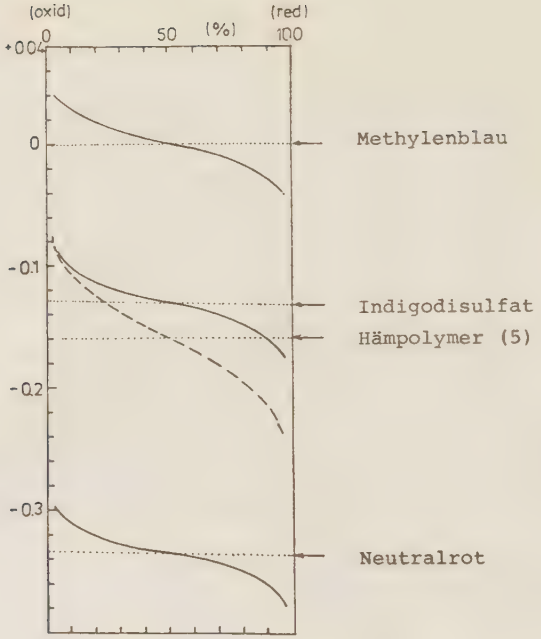


Abb. 26: Schematische Darstellung der Redoxpotentialbestimmung des Hämpolymers (5)

Da eine Anzahl von Hämproteinen wie etwa Tryptophan-Dioxygenase und Indolamin-Dioxygenase mit verschiedenartigen Indol-Derivaten reagieren kann [23], erscheint eine spezifische Reaktion des Indigo-Derivats mit dem Eisen-Porphyrin möglich. Das erhaltene UV-Spektrum konnte jedoch noch nicht zugeordnet werden, sodaß diese Frage offen bleibt.

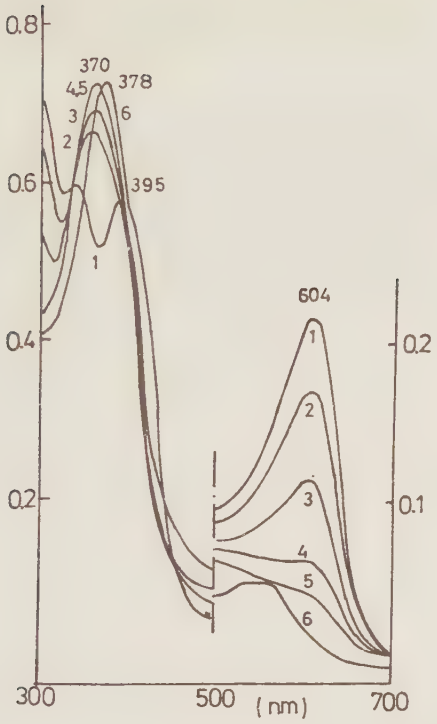


Abb. 27: Änderung des UV-Spektrums einer Mischung des Hämpolymers (1) mit Indigodisulfat durch Titration mit Natriumdithionit [Hämpolymer (1)] = 8 x 10^{-6} M, [Indigodisulfat] = 8 x 10^{-6} M, Reduktant = Natriumdithionit in 0.01 N NaOH, pH 7 bei 25°C

Aus diesem Grund konnte auch das Redoxpotential der Hämpolymere (1), (2), (3) und (4) nicht genau bestimmt werden,

aber ihre sehr negativen Redoxpotentiale (-200 mV bis -240 mV) können mit dem des Protohämins verglichen werden [57].

Man kann die Ergebnisse an den "Hämpolymer"-Modellsubstanzen so zusammenfassen, daß aufgrund ihrer sehr negativen Redoxpotentiale und ihres Reaktionsverhaltens gegenüber Sauerstoff und Kohlenmonoxid mehr Ähnlichkeit der "Hämpolymer"-Modellsubstanzen zu den Peroxidasen besteht, als zum Hämglobin (Hb) und Myoglobin (Mb).

3. Koordination der Histidin-Peptide an Eisen-Porphyrin in Wasser

3.1. Signifikanz des Histidinrestes als proximaler Ligand in Hämproteinen

Eine Anzahl von natürlichen Hämproteinen sind bekannt, die als proximalen Liganden einen Histidinrest aus dem Peptidanteil besitzen. Dazu gehören die mit Sauerstoff reagierenden Hämproteine, z.B. Hämoglobin (Hb), Myoglobin (Mb), und außerdem Cytochrom c-Oxidase, Peroxidasen und Dioxygenasen. Ihre Ferro-Form liegt als 5-fach-koordinierter, paramagnetischer High-spin (S = 2)-Komplex vor (s. Kapitel 1.2.3.).

Obwohl die Untersuchungen von Eisen-Porphyrin-Systemen mit 5-fach-koordinierten High-spin-Ferro-Komplex für das Verständnis der Biofunktion von Hämproteinen sehr interessant wären, werden die meisten künstlichen Eisen-Porphyrin-Derivate in Anwesenheit von Basen zum 6-fach-koordinierten Low-spin (S = 0)-Komplex stabilisiert.

Bei 2-substituierten Imidazol-Derivat ist bekannt, daß sie mit Eisen-Porphyrin-Derivaten vorzugsweise einen 5-fach-koordinierten High-spin-Ferro-Komplex eingehen können. Dabei zieht ein am Eisen(II)-Porphyrin koordiniertes Imidazol-Derivat wegen seines sterischen Effektes, das Eisenatom aus dem Porphyrinring heraus und erschwert die Koordination eines zweiten Imidazol-Derivates am Eisen-Porphyrin [58]. Ihre Komplexbildungskonstante ist jedoch in wässrigen Medien sehr gering, weil diese Imidazol-Derivate in neutralen Medien größtenteils als Imidazolium-Kationen existieren (pK_{Im} = 7.5-8.5). Somit steht für die Koordination zum Eisen kein freies Elektronenpaar des Stickstoffs zur Verfügung. Vor kurzem schlug TSUCHIDA

et al. vor, daß ein Homopolymer oder Copolymer des N-Vinyl-2-methylimidazols eine höhere Komplexbildungskonstante gegenüber Eisen-Porphyrin besitzt und der erhaltene 5-fach-koordinierte High-spin-Ferro-Komplex in Wasser/Ethylenglykol (1:1) bei -30°C mit Sauerstoff einen stabilen Komplex bilden kann [59]. Andererseits können die am Imidazolrest kovalent gebundenen Eisen-Porphyrin-Derivate auch einen 5-fach-koordinierten High-spin-Ferro-Komplex eingehen [60]. Ein natürlich vorkommendes Beispiel ist Häm c, in dem ein Histidinrest, aus dem am Porphyrinring kovalent gebundenen Peptidanteil, mit dem Eisenatom eine Koordinationsbindung eingeht [61]. TRAYLOR et al. zeigte, daß ein am N-Alkylimidazol gebundenes Eisen-Porphyrin-Derivat auch in wässrigen Medien mit Hilfe von Detergentien einen 5-fach-koordinierten High-spin-Ferro-Komplex eingeht. Diese Modellsysteme wurden in Bezug auf ihre Reaktivität gegenüber Sauerstoff und Kohlenmonoxid diskutiert [62].

In diesem Kapitel wird das Bindungsverhalten der Histidin-Peptide am Eisen-Porphyrin-System in wässrigen Medien vorgestellt. Darunter können auch einige Histidin-Peptide mit einem Eisen-Porphyrin einen 5-fach-koordinierten High-spin-Ferro-Komplex eingehen. Diese neuen High-spin-Ferro-Porphyrin-Modellsysteme wurden bezüglich ihrer Reaktivität gegenüber Sauerstoff und Kohlenmonoxid bzw. ihres Redoxpotentials im Vergleich zu natürlichen Hämproteinen untersucht.

3.2. Strategie der Histidin-Peptid-Synthese

3.2.1. Syntheseverfahren für Histidin-Peptide

Wegen der basischen und katalytischen Eigenschaften des Imidazolrings des Histidins treten bei der Synthese von

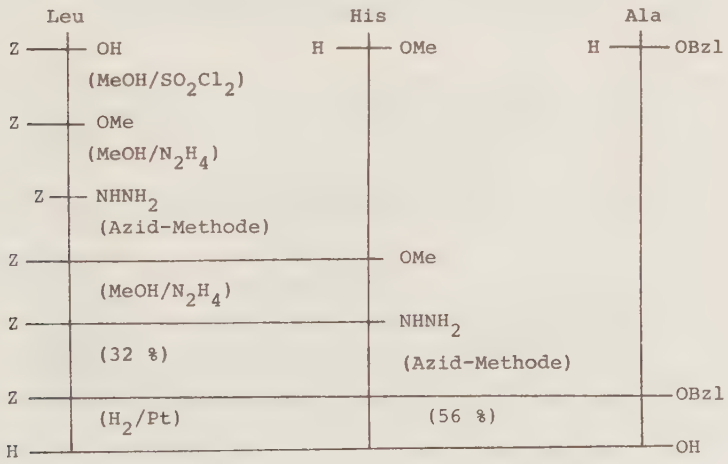
histidinhaltigen Peptiden einige unerwünschte Nebenreaktionen auf [63]. Daher wurde eine Zahl von Schutzgruppen für den Imidazol-Stickstoff des Histidins entwickelt [64]. Darunter wird die N_{Im}-Trityl-Gruppe wegen folgender Vorteile bei zahlreichen Peptid-Synthesen angewandt [65].

a) Die N_{Im}-Trityl-Gruppe ist unter allgemeinen Kupplungsbedingungen stabil und kann nur unter verschärften Acidolyse-Bedingungen, wie etwa Trifluoressigsäure (TfaOH), Ameisensäure (HCOOH) bzw. 6 N HCl/HBr, abgespalten werden.

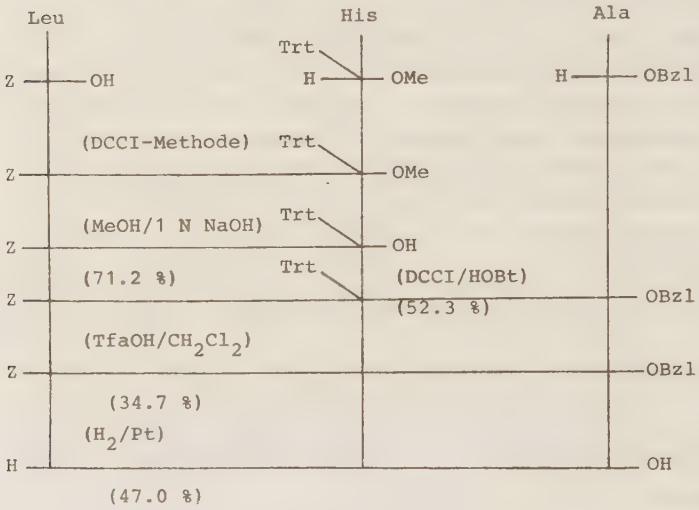
b) Die N_{Im}-Trityl-Gruppe erhöht die Löslichkeit des Peptidfragments in verschiedenen organischen Solventien.

Ausgehend vom N_{Im}-Trityl-histidin-Derivat wurde eine Anzahl von histidinhaltigen Tripeptiden (abgekürzt Histidin-Peptide) synthetisiert. Die verschiedenen Syntheseverfahren für das Histidin-Peptid (H-Leu-His-Ala-OH) werden in den Schemen (I) - (III) dargestellt.

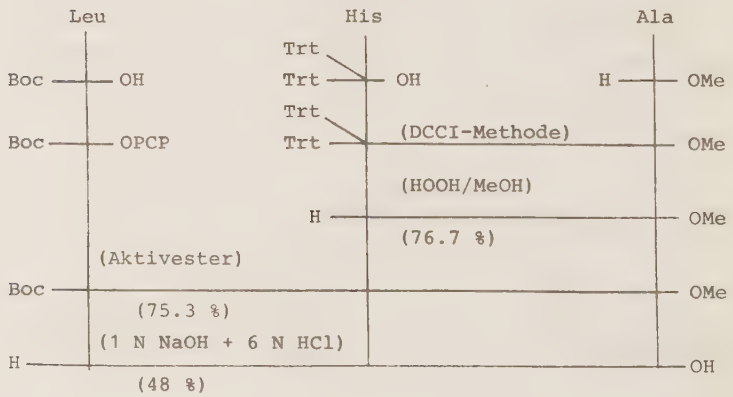
Schema I: Azid-Verfahren (Gesamtausbeute: 8.4 %)



Schema II: DCCI-Methode ausgehend von der N-terminalen Aminosäure (Gesamtausbeute: 6.1 %)



Schema III: DCCI-Methode ausgehend von der C-terminalen Aminosäure (Gesamtausbeute: 27.7 %)



Die Abspaltbarkeit der im Histidin-Peptid eingeführten Schutzgruppen unter verschiedenen Reaktionsbedingungen wird in Tabelle 8 zusammengestellt.

Tab. 8: Abspaltbarkeit der Schutzgruppen für Histidin-Peptid-Synthese

Schutzgruppe	H_2/Pt	4 N HCl /Dioxan	1.2 N HCl /AcOH	TfaOH/ CH_2Cl_2	HOOH /MeOH	1 N NaOH /Dioxan
N_{Im}-Trt-	(±)	±	±	+	++	-
Nα-Boc-	-	++	++	++	++	-
Nα-Z-	++	-	±	±	±	-
N_{α}-Trt-	++	++	++	++	++	-
-OMe	-	-	-	-	-	++
-OBzl	++	-	-	-	-	++

++ = quantitativ spaltbar; + = spaltbar, aber nicht quantitativ; - = nicht spaltbar; ± = teilweise spaltbar; ( ) = sehr langsam

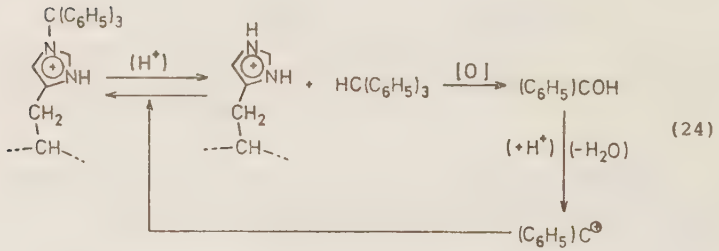
Damit kann das Syntheseverfahren für die N_{Im}-Trityl-Gruppe der Histidin-Peptide folgendermaßen charakterisiert werden:

a) Die N_{Im}-Trityl-Gruppe ergibt eine höhere Ausbeute bei Peptid-Kupplungen und vereinfacht den Arbeitsprozeß.

b) Durch die großvolumige Trityl-Gruppe nimmt jedoch die Reaktivität des Histidins ab. Dabei ist die geringe Ausbeute bei der Kupplung des Histidins mit höheren Peptiden besonders deutlich [66] (s. Kapitel 2.2.1.).

c) Die Abspaltung der N_{α}-Boc-Gruppe vom N_{Im}-Trt-histidin-haltigen Peptiden unter milden Acidolyse-Bedingungen (1.2 N HCl/AcOH bzw. 4 N HCl/Dioxan) ist von einer partiellen Abspaltung der N_{Im}-Trt-Gruppe begleitet (s.a. EXPERIMENTELLER TEIL, Kapitel 5.2.3. (a)).

d) Die Abspaltung der N_{Im}-Trt-Gruppe mit TfaOH, TfaOH/CH_2Cl_2 bzw. Ameisensäure ergibt eine unbefriedigende Ausbeute. Die Zugabe von Radikal-Fängern wie Anisol verbessert die Ausbeute nicht. Dagegen wird die vollständige Abspaltung der N_{Im}-Trt-Gruppen mit HCOOH/MeOH (1:1) bzw. wässrigen Säuren (50 %ige Ameisensäure oder 6 N Salzsäure) erreicht. Das schwer lösliche Triphenylcarbinol kann dann leicht in Wasser oder MeOH abgetrennt werden. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß die Rückreaktion über das entstehende Carbenium-Ion verhindert wird (Gleichung 24).



(24)

3.2.2. Zuordnung der ^{13}C-NMR-Spektren des Histidin-Peptids

Der Syntheseverlauf der Histidin-Peptide wurde mit ^{13}C-NMR-Spektroskopie verfolgt. Dabei ist die chemische Verschiebung jedes Kohlenstoffatoms abgesehen vom Einfluß der Solventien und von intermolekularen Wechselwirkungen

identisch [67]. Die ^{13}C-NMR-Spektren der erhaltenen Zwischenprodukte bei der Synthese von H-Leu-His-Ala-OH werden in den Abbildungen 28 - 31 zusammengestellt. Die ^{13}C-chemische Verschiebungen der vollgeschützten Histidin-Peptide (Z-X-His(Trt)-Ala-OBzl; X = Gly, Ala, Val, Leu und Ser) werden in Tabelle 9 zusammengefaßt.

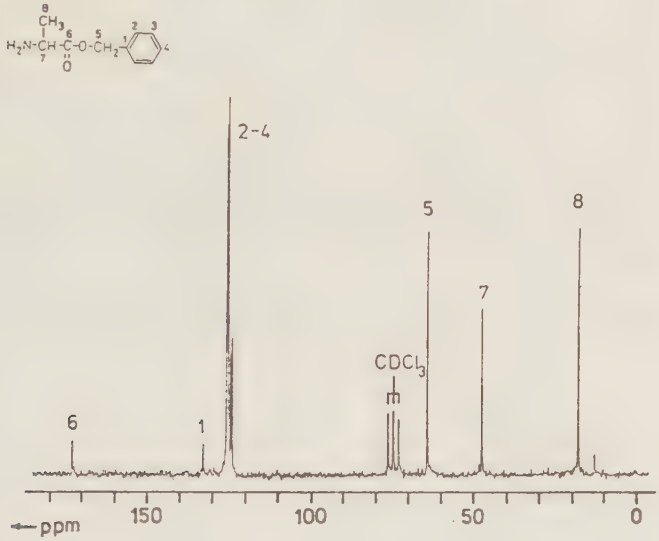


Abb. 28: ^{13}C-NMR-Spektrum von H-Ala-OBzl in $CDCl_3$

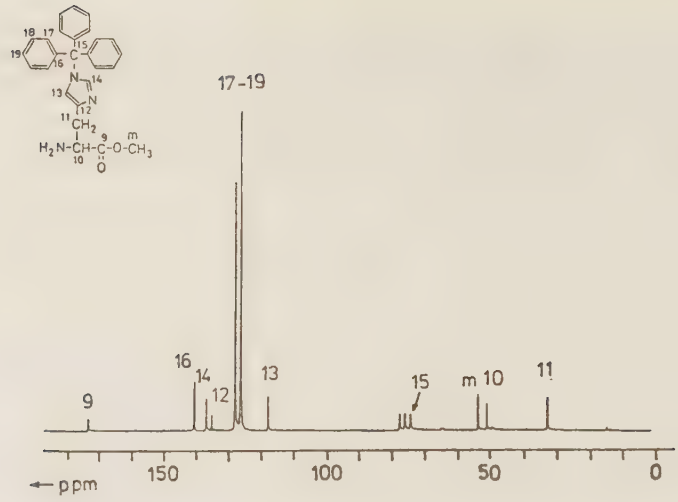


Abb. 29: ^{13}C-NMR-Spektrum von H-His(Trt)-OMe in $CDCl_3$

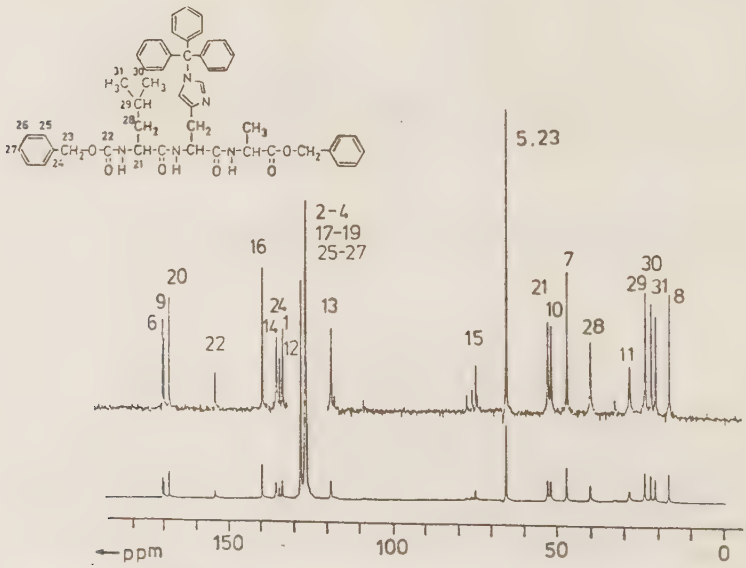
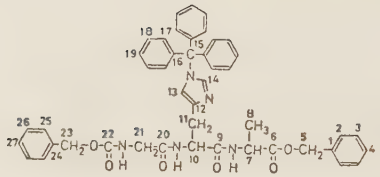


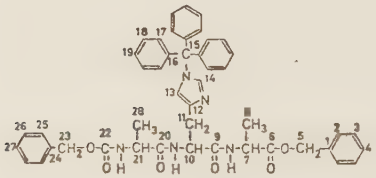
Abb. 30: ^{13}C-NMR-Spektrum von Z-Leu-His(Trt)-Ala-OBzl in $CDCl_3$

Tab. 9: ^{13}C-NMR-Daten der Histidin-Peptide, Z-X-His(Trt)-Ala-OBzl, in $CDCl_3$

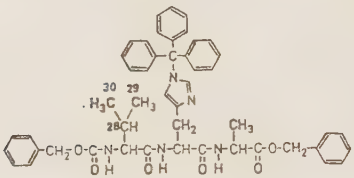
X-Fragment	Gly	Ala	Val	Leu	Ser(tBu)
-OBzl:					
C-1	136.2	135.3	135.6	135.3	135.6
C-2 - C-4		(126.7 - 128.4)			
C-5	66.8	66.4	66.6	66.4	66.8
-Ala-:					
C-6	172.1	172.0	172.1	172.3	172.0
C-7	48.2	48.0	48.1	48.0	48.0
C-8	17.8	17.4	17.3	17.2	17.7
-His(Trt)-:					
C-9	170.6	172.0	171.0	171.9	170.5
C-10	53.1	53.0	53.1	52.9	53.1
C-11	29.8	29.3	29.6	29.0	29.4
C-12	136.2	136.4	136.5	136.0	136.1
C-13	119.6	119.4	119.5	119.8	119.6
C-14	138.2	138.0	138.1	138.0	138.0
C-15	75.4	75.2	75.2	75.9	75.4
C-16 - C-19		(127.9 - 129.6)			
-X-:					
C-20	168.9	170.4	170.5	170.2	169.8
C-21	44.7	50.9	60.4	53.8	55.3
C-28	-	18.1	30.7	40.9	61.5
C-29	-	-	19.1	24.4	74.0
C-30	-	-	17.6	22.4	27.2
C-31	-	-	-	21.4	-
Z-:					
C-22	156.5	155.8	156.4	156.0	156.9
C-23	66.8	66.4	66.6	66.4	66.6
C-24	136.2	136.2	136.1	136.0	136.0
C-25 - C-27		(128.0 - 128.4)			



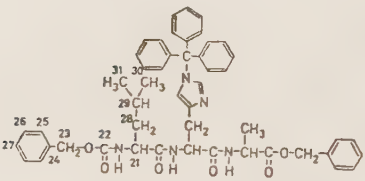
Z-Gly-His(Trt)-Ala-OBzl



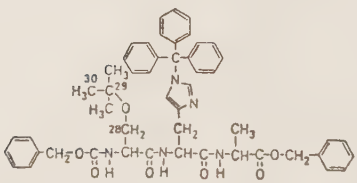
Z-Ala-His(Trt)-Ala-OBzl



Z-Val-His(Trt)-Ala-OBzl



Z-Leu-His(Trt)-Ala-OBzl



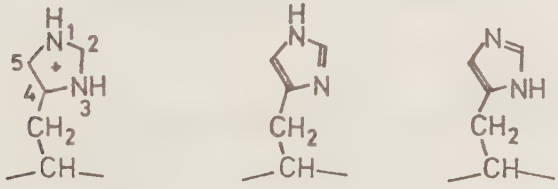
Z-Ser(tBu)-His(Trt)-
Ala-OBzl

Abb. 31: Nummerierung der Kohlenstoffatome in den Histidin-Peptiden

3.3. Molekulare Konformation der Histidin-Peptide

3.3.1. Tautomerie der Histidin-Peptide in DMSO-d_6

Die ^{13}C-NMR-Spektren der am Histidinrest nicht geschützten Peptide (Z-X-His-Ala-OBzl, X = Gly, Ala, Val, Leu, Ser) in DMSO-d_6 zeigen Unterschiede in der chemischen Verschiebung einiger Kohlenstoffatome des Peptids, die besonders bei denen des Histidinrestes deutlich zutage treten. Die Abbildung 33 stellt die ^{13}C-Spektren der Histidin-Peptide im aromatischen Bereich (110 - 150 ppm) zusammen. Obwohl einige ^{13}C-Signale des Imidazolrings durch die starken Resonanzen der Z- und -OBzl-Gruppe überdeckt werden, können die Resonanzen von C-2, C-4 und C-5 des Imidazolrings nach [68] zugeordnet werden. Diese chemischen Verschiebungen des Histidinrestes entstehen aus einer Tautomerie des Imidazolrings [69], die in einem neutralen Solvens drei molekulare Formen des Histidinrestes ergeben können (Abbildung 32).



Imidazolium-Ion (ImH^+-Form) | N_τ-H-Tautomer (N_τ-H-Form) | N_π-H-Tautomer (N_π-H-Form)

Abb. 32: Mögliche Formen des Histidinrestes in neutralen Solventien

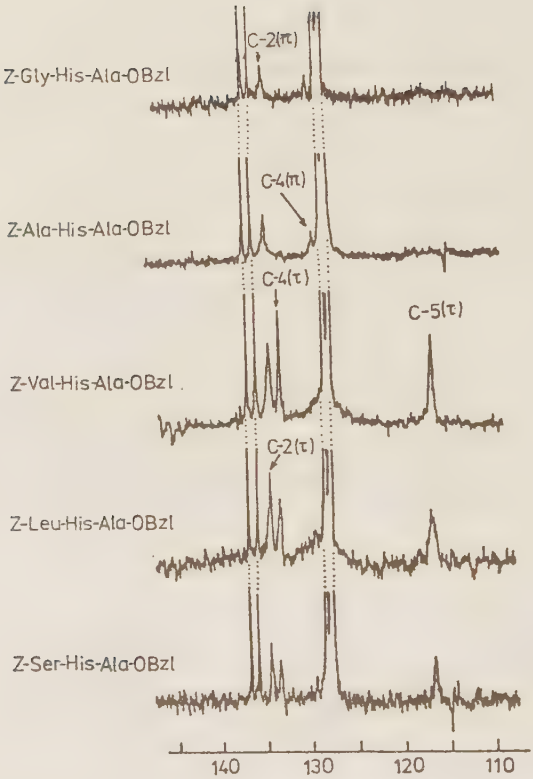


Abb. 33: ^{13}C-NMR der Histidin-Peptide im aromatischen Bereich (110 - 150 ppm)
Solvens = DMSO-d_6, Konz. = etwa 100 mg/2 ml

Das ^{13}C-Signal des C-4 (133.4 ppm) und des C-5 (116.7 ppm) im Histidin-Peptid (X = Val, Leu, Ser) wird durch eine Auswechselung der X-Gruppe gegen Gly oder Ala nach 127.5 - 129.5 ppm verschoben. Zusätzlich beobachtet man einen Effekt auf die ^{13}C-Signale der α- und β-C-Atome des Histidins, wie Tabelle 10 zeigt.

Tab. 10: ^{13}C-NMR-Verschiebung der Histidin-Peptide, Z-X-His-Ala-OBzl, in DMSO-d_6

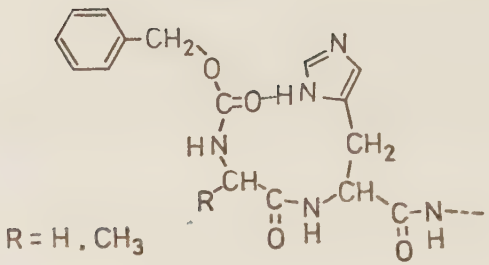
X-Fragment	Gly	Ala	Val	Leu	Ser
Z-(C=O)	156.5	155.9	156.4(3) 156.2(7)	156.0	156.1
His(C-α)	52.5	52.4	52.2	52.6(1) 52.2(9)	52.6
His(C-β)	29.2	29.5	29.6	29.4	29.2(5) 29.0(5)

( ): Intensitätsverhältnis

Aufgrund ihrer ^{13}C-NMR-Spektren kann man diese fünf Histidin-Peptide in drei Gruppen einteilen.

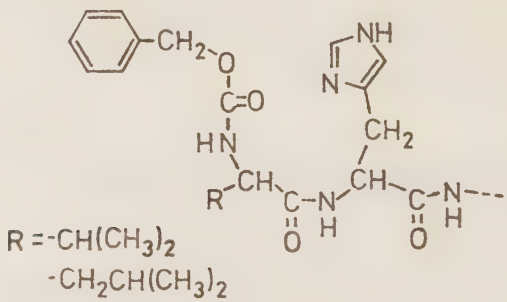
Gruppe I: Z-X-His-Ala-OBzl (X = Gly, Ala)

Diese Histidin-Peptide existieren in DMSO-d_6 größtenteils als N_π-H-Tautomer, wobei der Carbonyl-Sauerstoff der Z-Gruppe durch eine Wasserstoffbrücken-Bindung mit dem N_π-Proton des Imidazolrings verbunden ist.



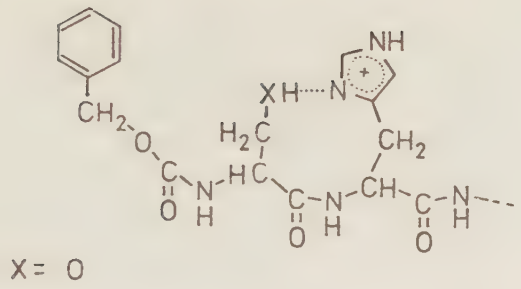
Gruppe II: Z-X-His-Ala-OBzl (X = Val, Leu)

Diese Histidin-Peptide existieren in DMSO-d_6 als thermodynamisch günstiges N_τ-H-Tautomer [69], wobei das Carbonyl-Sauerstoffatom der Z-Gruppe wegen der voluminösen Seitenkette des X-Fragments für eine Wasserstoffbrücken-Bindung zu weit entfernt ist.



Gruppe III: Z-X-His-Ala-OBzl (X = Ser)

Dieses Histidin-Peptid existiert in DMSO-d_6 als Imidazolium-Kation, wobei das N_τ-H-Tautomer über das π-Stickstoffatom mit der Hydroxy-Gruppe des Serins eine Wasserstoffbrücken-Bindung eingeht.



X= O

Um diese Vermutungen über die Konformation der Histidin-Peptide zu bestätigen, wurden weitere Untersuchungen an ungeschützten Peptiden in Wasser durchgeführt.

3.3.2. Titrationskurve der Histidin-Peptide

Die Titrationskurven der Histidin-Peptide (Z-X-His-Ala-OBzl, X = Gly, Ala, Val, Leu, Ser) und des Histidins werden in Abbildung 34 zusammengefaßt. Der pK_{Im}-Wert des Histidin-Peptids beträgt in etwa 6.50 - 6.65, der zwar von der Position des Histidins in der Peptid-Kette, aber nur wenig vom X-Fragment beeinflußt wird [70].

Die Titrationskurven der Histidin-Peptide zeigen im Gegensatz zu der des Histidins um pH 7 eine starke Pufferwirkung, d.h. daß das Protonierungsgleichgewicht des Imidazolrestes durch seine pH-Änderung in diesem Bereich stark verschoben wird.

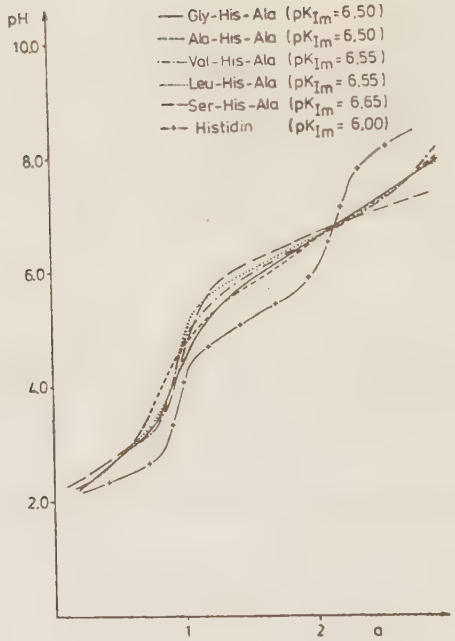


Abb. 34: Titrationskurve der Histidin-Peptide
Messmethode: Eine 10 mM Peptid-dihydrochlorid-Lösung (10 ml) wurde mit 0.01 N NaOH titriert.

3.3.3. Circulardichroismus der Histidin-Peptide

Das CD-Spektrum der Histidin-Peptide wird von der Peptid-Bindung und dem Imidazolring des Histidins geprägt. Letzterer gibt zwischen 206 und 212 nm aufgrund eines $\pi - \pi^*$-Übergangs der Imidazol-Gruppe ein Maximum [71]. Bei kleinen Peptiden ist der Beitrag der Imidazol-Gruppe dominant und empfindlich gegenüber der Konformation des Imidazolrings

in der Peptid-Kette. Abbildung 36 zeigt die CD-Spektren der Histidin-Peptide (H-X-His-Ala-OH, X = Gly, Ala, Val, Leu, Ser) und des Histidins bei pH 7.0. Diese Spektren lassen sich mit dem Spektrum des H-Gly-His-Gly-OH nach JACKLE et al. [72] vergleichen. Vorausgesetzt, daß diese Reihe von Histidin-Peptiden bei pH 7 hauptsächlich in der G^--Konformation des Histidinrestes (> 50 %) existiert [72], kann man die Konformation der Histidin-Peptide bei pH 7.0 folgendermaßen interpretieren:

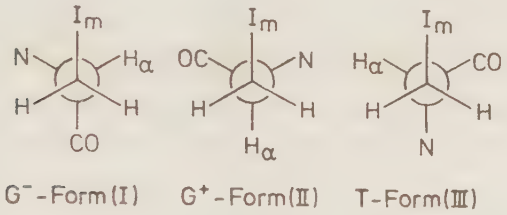


Abb. 35: Konformationen des Imidazolrestes in der Peptid-Kette

Gruppe I: H-X-His-Ala-OH (X = Ala) und Histidin

Der Imidazolring bei diesen Histidin-Peptiden ergibt eine positive elliptische Polarität zwischen 210 und 222 nm und weist darauf hin, daß der Imidazolring durch intramolekulare Wechselwirkungen in seiner freien Rotation behindert wird. Die N-terminale Amino-Gruppe hat dabei die Möglichkeit, mit dem π-N-Atom des Histidinrestes eine Wasserstoffbrücken-Bindung zu bilden.

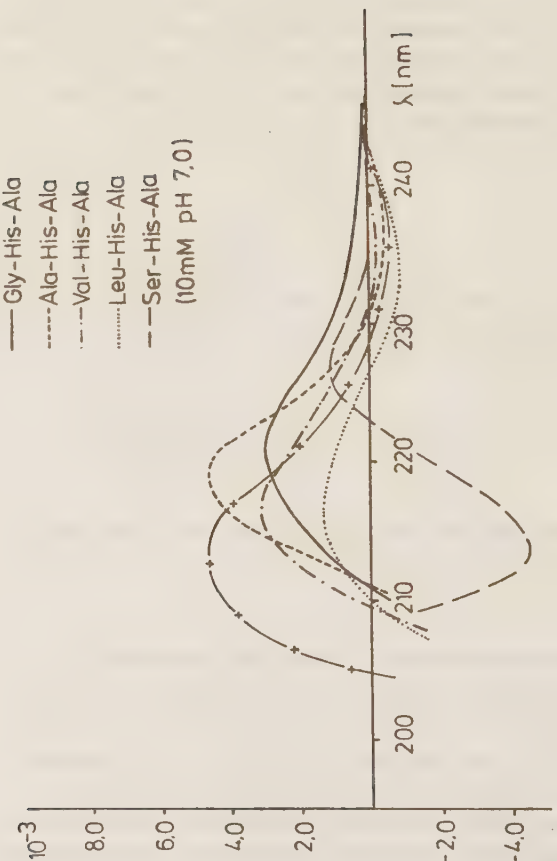
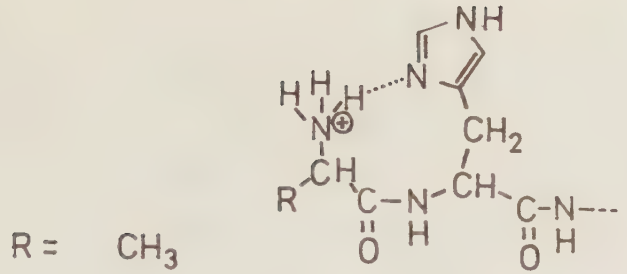
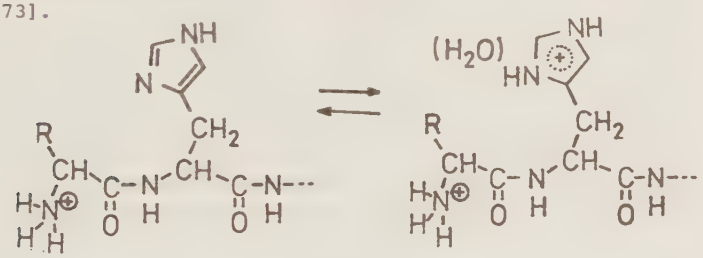


Abb. 36: CD-Spektren der Histidin-Peptide und des Histidins bei pH 7.0 (10 mM)



Gruppe II: H-X-His-Ala-OH (X = Gly, Val, Leu)

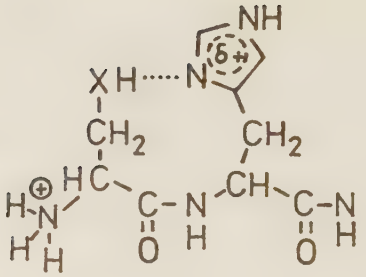
Die elliptische Polarität des Imidazolrings bei Histidin-Peptid ist sehr gering. Es existiert der Imidazolrest als Mischung von (NH_3^+, ImH^+, COO^-)-Form und (NH_3^+, Im, COO^-)-Form, in denen die elliptische Polarität des Imidazolrings einen negativen bzw. einen positiven Wert besitzt [73].



R = -H, $-CH(CH_3)_2$, $-CH_2CH(CH_3)_2$

Gruppe III: H-Ser-His-Ala-OH

Dieses Peptid unterscheidet sich von anderen Histidin-Peptiden dadurch, daß die elliptische Polarität des Imidazolrings negativ ist, d.h. daß der Imidazolring größtenteils als ein Imidazolium-Kation vorliegt. Dieses Verhalten zeigt, daß das τ-H Tautomer des Histidinrestes eine Wasserstoffbrücken-Bindung zwischen dem π-N-Atom des Imidazolrings und der Hydroxy-Gruppe des Serinrestes eingeht.



X = O

3.4. Komplexbildung der Histidin-Peptide mit dem Eisen(+2)-Porphyrin in Wasser

Das Komplexbildungsverhalten der Histidin-Peptide mit der Ferro-Form des Hämpolymers (1) [MeO-Gly-Häm-Gly-POE_{10000}] wurde in einer Puffer-Lösung bei pH 7.0 untersucht. Dabei kann das Hämpolymer (1) durch eine Koordination des Histidin-Peptids einen 5-fach-koordinierten High-spin-Komplex eingehen, der anschließend durch eine weitere Koordination des zweiten Histidin-Peptids einen 6-fach-koordinierten Low-spin-Komplex eingeht (Gleichung 25 und 26).

$$Fe^{2+}P + L \underset{}{\overset{K_1}{\rightleftharpoons}} Fe^{2+}P(L) \quad \text{(High-spin)} \qquad (25)$$

$$Fe^{2+}P(L) + L \underset{}{\overset{K_2}{\rightleftharpoons}} Fe^{2+}P(L)_2 \quad \text{(Low-spin)} \qquad (26)$$

Da die Gleichgewichtskonstante K_2 meistens sehr viel größer als K_1 ist [75], entsteht der 5-fach-koordinierte High-spin-Komplex bei Zusatz von überschüssiger Base nur als intermediäres Zwischenprodukt. Bei Zusatz von Histidin-

Peptiden kann jedoch das Hämpolymer (1) in einem definierten Konzentrationsbereich des Peptids einen 5-fach-koordinierten High-spin-Ferro-Komplex als überwiegendes Produkt bilden. Die Abbildung 37 zeigt die Änderung des UV-Spektrums des Hämpolymers (1) in Abhängigkeit von der Konzentration an H-Ala-His-Ala-OH. Dabei wandelt sich das Hämpolymer (1) bei Konzentrationen des Peptids zwischen 15 mM und 30 mM durch Koordination eines Histidin-Peptids an der Häm-Gruppe zum 5-fach-koordinierten High-spin-Komplex um. Eine weitere Konzentrationssteigerung des Peptids ($>$ 40 mM) führt zur weiteren Koordination eines zweiten Histidin-Peptids, unter Ausbildung des UV-Spektrums eines 6-fach-koordinierten Low-spin-Ferro-Komplexes.

Obwohl bei den anderen Histidin-Peptiden eine ähnliche Tendenz beobachtet wird, erlaubt die schlechte Löslichkeit der Histidin-Peptide in wässrigen Medien keine höheren Konzentrationen, zu einer vollständigen Ausbildung des 6-fach-koordinierten Komplexes führen würden. Dabei ist die Löslichkeitsgrenze von H-Gly-His-Ala-OH und H-Val-His-Ala-OH etwa 4.5 mg/ml (15 mM) und bei dieser Konzentration zeigt das UV-Spektrum des Hämpolymers (1) denselben Verlauf wie bei einer Mischung von 4-fach- und 5-fach-koordinierten Ferro-Komplexen. Bei Zusatz von H-Leu-His-Ala-OH und H-Ser-His-Ala-OH wandelt sich das Hämpolymer (1) in einem Konzentrationsbereich zwischen 25 mM und 40 mM bzw. 10 mM und 35 mM zum 5-fach-koordinierten High-spin-Ferro-Komplex um. Aufgrund dieser schlechten Löslichkeit der Histidin-Peptide wurden weitere Untersuchungen in Anwesenheit von Detergentien (Dodecylsulfat: SDS) durchgeführt. Das Detergenz bewirkt, daß das Hämpolymer (1) in wässrigem Medium im monomeren Zustand existiert, und die Komplexbildungskonstante des Histidin-Peptids wird gegenüber dem Hämpolymer (1) mehrfach erhöht. Das Hämpolymer (1) liegt in einer 10 mM Histidin-Peptid-Lösung bei Anwesenheit von etwa 0.01 bis 0.05 % w/v Dodecylsulfat bei pH 7.0

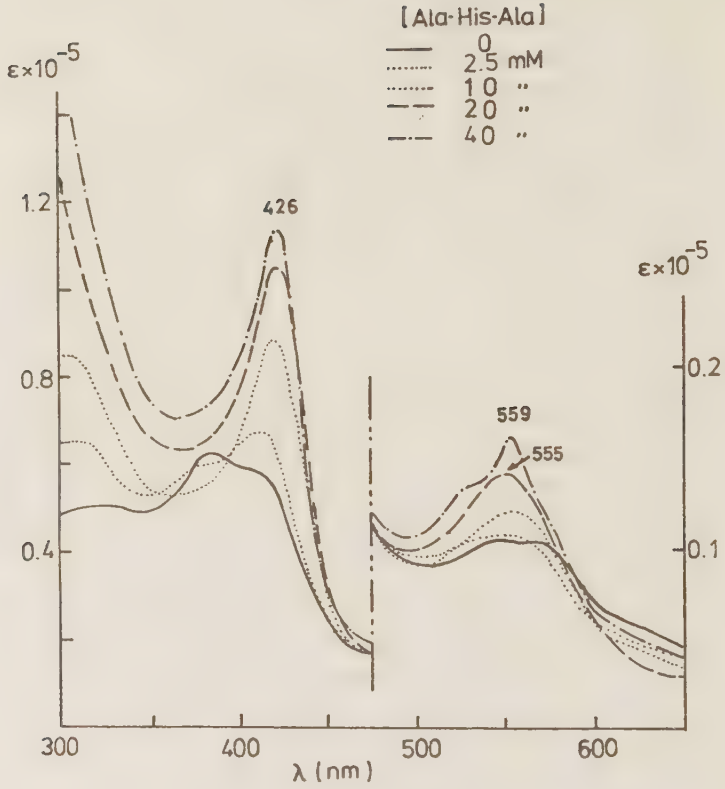


Abb. 37: Änderung des UV-Spektrums von Hämpolymer (1) in Abhängigkeit von der Konzentration des Histidin-Peptids (H-Ala-His-Ala-OH) bei pH 7

[Hämpolymer] = 10^{-5} M, in 0.05 M Phosphat-Puffer pH 7.0 bei 25°C; Reduktant = Natriumdithionit in 0.01 N NaOH

in seiner Ferri-Form meistens als Hämatin (Soret-Bande 411 - 412 nm) und seiner Ferro-Form als High-spin-Komplex (Soret-Bande 425 - 427 nm) vor.
Das bedeutet, daß in einer Micelle des Dodecylsulfats je eine Häm-Gruppe und ein Histidin-Peptid coordinativ gebunden vorliegen. Ausnahmen treten im Falle des H-Gly-His-Ala-OH und H-Val-His-Ala-OH auf, denn die Koordination am Hämpolymer (1) ist wegen der niedrigen Komplexbildungskonstante unvollständig. Die UV-Spektren der Ferri- und Ferro-Komplexe des Hämpolymers (1) mit den Histidin-Peptiden und dem Histidin werden in Tabelle 11 zusammengestellt.

Deutliche Unterschiede in den UV-Spektren des Ferro-Komplexes findet man besonders bei ihren Q-Banden, die in Abbildung 38 schematisch zusammengestellt sind. Diese Änderungen des UV-Spektrums von Hämpolymer (1) in Abhängigkeit vom X-Fragment des Histidin-Peptids (H-X-His-Ala-OH) kann man in Bezug auf die Komplexklassen des Eisen(II)-Porphyrin-Komplexes in Übereinstimmung bringen. Damit können die Histidin-Peptide ausgehend von ihrem Komplexbildungsverhalten mit dem Hämpolymer (1) in drei Gruppen eingeteilt werden.

Gruppe I: H-X-His-Ala-OH (X = Gly, Val)

Diese Histidin-Peptide besitzen eine sehr niedrige Komplexbildungskonstante gegenüber Eisen-Porphyrinen. Damit zeigen die Spektren ihrer Komplexe mit dem Hämpolymer (1) einen ähnlichen Verlauf wie eine Mischung von 4-fach-koordinierten intermediären- und 5-fach-koordinierten High-spin-Ferro-Komplexen.

Tab. 11: UV-Spektren der Ferri- und Ferro-Form des Hämpolymers bei Zusatz von Histidin-Peptiden

Histidin-Peptid	Fe^{3+} Soret-Bande (nm)	Fe^{2+} Soret-Q-Bande (nm)		
H-Gly-His-Ala-OH	403	427	540	566
	(89)	(82)	(8.5)	(9.8)
H-Ala-His-Ala-OH	412	426	528	559
	(118)	(106)	(7.7)	(13.0)
H-Val-His-Ala-OH	408	426	540	568
	(106)	(95)	(9.8)	(10.8)
H-Leu-His-Ala-OH	411	524	557	
	(105)	(94)	(11.5)	
H-Ser-His-Ala-OH	411	425	557	
	(111)	(96)	(12.6)	
Histidin[+)]	407	422	527	558
	(98)	(102)	(10.5)	(15.5)

[Hämpolymer (1)] = 10^{-5} M, [Histidin-Peptid] = 10 mM
[+)] [Histidin] = 40 mM, [SDS] = 0.01 - 0.05 % w/v
Reduktionsmittel = Natriumdithionit in 0.01 N NaOH in 0.05 M Phosphat-Puffer pH 7.0 bei 25°C
( ): Extinktionskoeffizient x 10^{-3}

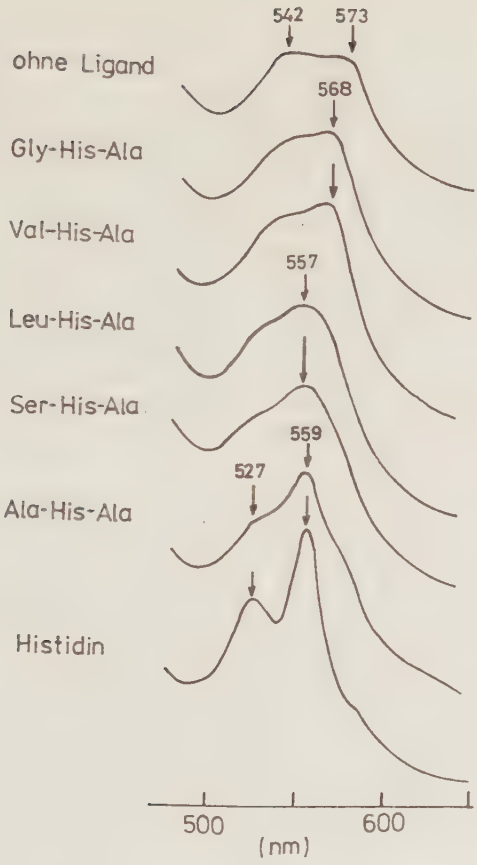


Abb. 38: UV-Spektren des Hämpolymers (1) im Q-Banden-Bereich bei Zusatz von Histidin-Peptiden

[Hämpolymer] = 10^{-5} M, [Histidin-Peptid] = 10 mM
[Histidin] = 40 mM; [SDS] = 0.01 - 0.05 % w/v
Reduktionsmittel = Natriumdithionit in 0.01 N NaOH,
in 0.05 M Phosphat-Puffer pH 7.0 bei 25°C

Gruppe II: H-Ala-His-Ala-OH

Das Histidin-Peptid kann innerhalb eines gewissen Konzentrationsbereiches von 5-10 mMol mit einem Eisen(II)-Porphyrin einen 5-fach-koordinierten High-spin-Komplex eingehen, jedoch stabilisiert es eher einen 6-fach-koordinierten Low-spin-Komplex. Wenn man dem Vorschlag von TRAYLOR et al. folgt [76], kann man die Gruppe II als "unstrained ligands" (lockere Liganden) klassifizieren. Da die Imidazol-Gruppe des Histidin-Peptids nur eine schwache intramolekulare Wechselwirkung besitzt, koordiniert der Ligand mit Eisen(II)-Porphyrinen vertikal gegen die Porphyrinebene. Damit kann der erhaltene 5-fach-koordinierte High-spin-Komplex durch den π-Überlappungscharakter eine weitere Koordination des zweiten Liganden ermöglichen (s.a. Kapitel 1.2.3.).

Gruppe III: H-X-His-Ala-OH (X = Ser, Leu)

Diese Histidin-Peptide können mit Eisen-Porphyrinen einen stabilen 5-fach-koordinierten High-spin-Ferro-Komplex eingehen. Das UV-Spektrum der Komplexe ähnelt denen des Hämpolymers (1), dem des Mb oder des HRP (s. Tabelle 6). Es wird vermutet, daß diese Histidin-Peptide durch eine Wasserstoffbrücken-Bindung am Histidinrest (X = Ser) oder durch eine voluminöse, hydrophobe Seitenkette des X-Fragments (X = Leu) das Eisen(II)-Atom aus der Porphyrinebene stark herausziehen können. Damit erschwert der 5-fach-koordinierte High-spin-Ferro-Komplex die weitere Koordination des zweiten Peptidliganden.

Diese Eisen(II)-Porphyrin-Komplexe können mit dem Hämoglobin (Hb) im T-Zustand oder der Peroxidase verglichen werden (s. Kapitel 1.2.3.).

Wenn man die Ferro-Form der vorgestellten "Hämpolymer"-Modellsubstanzen überprüft, kann der im Hämpolymer eingeführte Histidinrest ebenso mit diesen Liganden-Gruppen

übereinstimmen. Dabei entspricht der Peptidanteil der Hämpolymere (2) und (3) der Gruppe I, bzw. der des Hämpolymers (4) der Gruppe II.

Ausgehend von der konformativen Betrachtung der Histidin-Peptide (s. Kapitel 3.3.), kann man die Beziehung zwischen Komplexbindungsverhalten und molekularer Konformation des Histidin-Peptids folgendermaßen zusammenfassen:

a) Beim H-Ser-His-Ala-OH spielt die Wasserstoffbrücken-Bindung des Imidazolrestes mit der Hydroxy-Gruppe des Serinrestes für die Komplexbildung mit Eisen-Porphyrinen eine wichtige Rolle. Die Wasserstoffbrücken-Bindung des Imidazolrestes mit der N-terminalen Amino-Gruppe des Peptids, z.B. H-Ala-His-Ala-OH und Histidin, kann dagegen das Komplexbildungsverhalten gegenüber Eisen(II)-Porphyrin nur wenig beeinflußt werden.

b) Das Komplexbildungsverhalten der Histidin-Peptide ist abhängig von dem ionischen Zustand des Imidazolrestes. In neutralen Medien kann das in kationischer Form vorliegende Histidin-Peptid wie etwa H-Ser-His-Ala-OH und H-Leu-His-Ala-OH, einen 5-fach-koordinierten High-spin-Ferro-Komplex stabilisieren, wogegen in neutraler Form vorliegendes Histidin-Peptid, wie etwa H-Ala-His-Ala-OH, die Bildung eines 6-fach-koordinierten Low-spin-Ferro-Komplexes ermöglicht. Dieses Verhalten kann aufgrund des Circulardichroismus des Imidazolrestes vermutet werden. Dabei ist es nicht nur vom pK_{Im}-Wert des Imidazolrestes, sondern auch von intramolekularen Wechselwirkungen, z.B. Wasserstoffbrücken-Bindungen, abhängig.

3.5. Reaktivität des an Histidin-Peptid gebundenen Hämpolymers (1) gegenüber Sauerstoff und Kohlenmonoxid

Der Sauerstoff-Komplex des an Histidin-Peptid gebundenen Hämpolymers (1) ist vor allem bei Raumtemperatur instabil. Der Ferro-Komplex wird bei Einleitung von Sauerstoff schnell bis zur Ferri-Form oxidiert. Merkwürdig ist, daß ein UV-Spektrum des Ferryl-oxo-Komplex bei Zusatz der Ligand-Gruppe II (H-Ser-His-Ala-OH und H-Leu-His-Ala-OH) beobachtet wird. Die Abbildung 39 zeigt den Fall von H-Leu-His-AlaOH. Die Bildung des Ferryl-oxo-Komplexes wird von einer Spur Hydroperoxid aus Dithionit verursacht (s. Kapitel 2.6.3.). In Anwesenheit von anderen Histidin-Peptiden wird jedoch die Bildung des Ferryl-oxo-Komplexes nicht beobachtet.

Bei der Einleitung von Kohlenmonoxid wandelt sich das Hämpolymer (1) zum Ferro -CO-Komplex um. Bei Zusatz von Histidin-Peptid zeigt das UV-Spektrum dieselbe Absorption bei den Q-Banden (536 nm und 565 nm), jedoch unterscheiden sich die Histidin-Peptide in ihrer Soret-Bande, wie in Tabelle 12 dargestellt wird.

Tab. 12: Soret-Bande des CO-Komplexes von Hämpolymer (1) bei Anwesenheit von Histidin-Peptiden

Ligand	(H-X-His-Ala-OH)						
	ohne	His	Gly	Ala	Val	Leu	Ser
nm	407	416	412	417	413	416	417
	(110)	(112)	(123)	(202)	(110)	(140)	(146)

( ): Extinktionskoeffizient x 10^{-3}

[Hämpolymer] = 10^{-5} M, [Histidin-Peptid] = 10 mM, [His] = 40 mM, [SDS] = 0.01 - 0.05 % w/v, unter 1 atm CO, bei 25°C

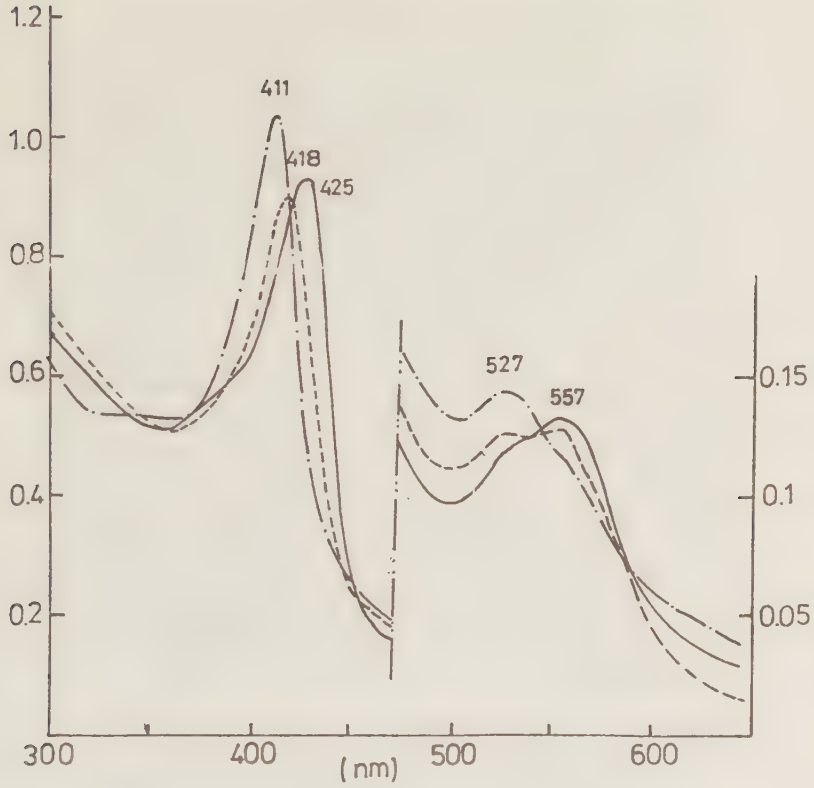


Abb. 39: Änderung des UV-Spektrums von Hämpolymer (1) und H-Leu-His-Ala-OH Komplexes bei Zusatz von Sauerstoff bei pH 7.0

$[Fe^{2+}] = 10^{-5}$ M, [H-Leu-His-Ala-OH] = 10 mM, [SDS] = etwa 0.02 % w/v,

-----: unter Zusatz von 2 ml O_2 (P_{O_2} = etwa 10 mm Hg)

Das UV-Spektrum bei der Liganden-Gruppe I erweist sich als eine Mischung von 5-fach- und 6-fach-koordinierten Ferro-CO-Komplexen, wie es auch von den Ferro-Komplexen erwartet wird. Die Unterschiede zwischen den Liganden-Gruppen II und III liegen in der Extinktion der Soret-Bande. Der CO-Komplex mit H-Ala-His-Ala-OH weist eine hohe Absorption der Soret-Bande auf, wogegen der CO-Komplex der Liganden-Gruppe III wesentlich kleinere Extinktionen der Soret-Bande zeigt. Einen ähnlichen Unterschied bemerkt man auch bei dem Myoglobin (Mb) und der Peroxidase (HRP), wie in Tabelle 6 gezeigt wird. Die große Extinktion des CO-Komplexes bei H-Ala-His-Ala-OH kann mit einem höheren Kovalenzbindungscharakter der Fe^{2+}-CO-Bindung erklärt werden [49]. Dabei wird die Fe^{2+}-CO-Bindung durch die weit reichende π-π-Überlappung gestärkt. Demgegenüber wird die Fe^{2+}-CO-Bindung bei der Liganden-Gruppe III durch die deformierte molekulare Konformation der Häm-Gruppe in der π-π-Überlappung etwas geschwächt. Eine niedrige optische Dichte bei dem Histidin ergibt die Möglichkeit, daß ein zweites Histidin auf der distalen Seite des Häms mit dem koordinierten Kohlenmonoxid eine Dipol-Dipol-Wechselwirkung einzugehen vermag [20].

Die CO-Komplexe bei diesen Eisen-Porphyrin-Systemen werden ähnlich wie bei den "Hämpolymer"-Modellsubstanzen unter Zusatz von Sauerstoff langsam bis zur Ferri-Form oxidiert. Die Stabilität des CO-Komplexes gegenüber Sauerstoff nimmt in der Reihenfolge der Peptide, H-Ala-His-Ala-OH > H-Ser-His-Ala-OH > H-Leu-His-Ala-OH > H-Val-His-Ala-OH > H-Gly-His-Ala-OH ab.

3.6. Redoxpotential des an Histidin-Peptid gebundenen Hämpolymers (1)

Das Redoxpotential des Hämpolymers (1) in Anwesenheit von 10 mM Histidin-Peptid wurde unter Zusatz von Dodecylsulfat im Vergleich zu Redoxindikatoren bei pH 7.0 bestimmt. Dabei liegt das Redoxpotential dieser Eisen-Porphyrin-Systeme etwa zwischen -150 mV und -160 mV (Tabelle 13).

Tab. 13: Redoxpotential des an Histidin-Peptid gebundenen Hämpolymers (1) bei pH 7.0

H-X-His-Ala-OH

X	Gly	Ala	Val	Leu	Ser
(mV)	-154	-160	-155	-160	-152

Redoxindikator = Methylenblau, Indigodisulfat und Neutralrot

Reduktant = Natriumdithionit in 0.01 N NaOH, mit der gleichen Methode, wie in Kapitel 2.7. beschrieben.

Wenn man an das positive Redoxpotential des Hb und Mb bzw. an das stark negative Redoxpotential der Peroxidasen denkt, muß man zur Erklärung der unterschiedlichen Redoxpotentiale der natürlichen Hämproteinen weitere Faktoren in Betracht ziehen, z.B.

1. Stabile Wasserstoffbrücken-Bindung am Imidazolrest des proximalen Histidins

Obwohl die hier vorgestellten Histidin-Peptide ein Wasserstoffbrückenbindungen zeigen, wird diese Wechselwirkung durch Solvatation in Wasser stark beschränkt, wo-

durch das Redoxpotential des Eisen-Porphyrins nur wenig beeinflußt wird. Deshalb kann der starke Einfluß der Wasserstoffbrückenbindung am proximalen Histidinrest nur auftreten, wenn durch die voluminöse Struktur des Eisen-Porphyrin-Komplexes, der Einfluß des Wassers zurückgedrängt wird. Ein Einfluß von Wasserstoffbrückenbindung auf das Redoxpotential von Eisenkomplexen, ist bei den Eisen-Schwefel-Proteinen (Ferrodoxine) nachgewiesen worden. Das Redoxpotential des Eisen-Komplexes wird durch je eine Wasserstoffbrücken-Bindung der Schwefel-Liganden mit einer Amido-Gruppe aus dem Peptidanteil etwa um 70 mV bis 80 mV gesteigert [77].

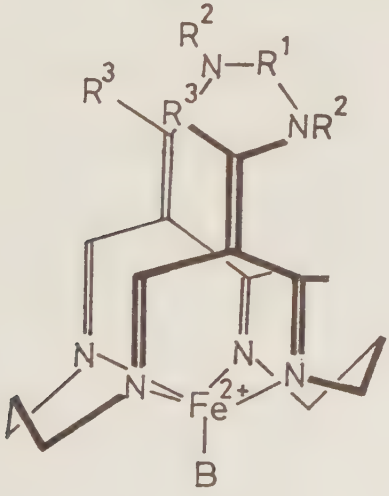
2. Einfluß von der distalen Seite der Häm-Gruppe

Der Einfluß von der distalen Seite der Häm-Gruppe wird bei den hier vorgestellten Eisen-Porphyrin-Systemen mit Ausnahme des Hämpolymers (5) nicht berücksichtigt. Zwei Beispiele hierfür findet man bei Cytochrom P-450 und Tryptophan-Dioxygenase. Hier wird das Redoxpotential durch eine Komplexbildung der Häm-Gruppe mit einem Substrat, z.B. Campher bei dem Cytochrom P-450 bzw. Trypthophan bei der Trypthophan-Dioxygenase, etwa um 100 mV bis 200 mV gesteigert [23,24].
Der Einfluß der Hydrophobizität auf der distalen Seite des Häms ist auch wahrscheinlich, besitzt doch die "Häm-Tasche" des Mb und Hb im Gegensatz zur Peroxidase eine sehr hydrophobe Umgebung.

Tatsache ist, daß die Untersuchungen der künstlichen Eisen-Porphyrin-Modellsysteme für das Hb und Mb, bzw. für andere Hämproteine, wegen der technischen Schwierigkeiten [55] oder den schlechten Löslichkeiten in Wasser, in Bezug auf ihren Redoxpotential noch nicht genügend diskutiert worden sind. Deshalb bleibt es noch eine ungelöste Frage, ob ein 5-fach-koordiniertes High-spin-Ferro-Porphyrin-System

mit einem positiven Redoxpotential für die reversible Oxygenierung eine unverläßliche Voraussetzung ist. Neuerdings fand die Arbeitsgruppe um BUSCH heraus, daß ein neuer 5-fach-koordinierter High-spin-Ferro-Komplex (Lacunar-Komplex, Abbildung 40) ein positives Redoxpotential (+60 mV) besitzt, und in wässrigen Medien (z.B. Aceton/Wasser/Acetonitril = 3:1:1) bei Raumtemperatur mehrmals Sauerstoff reversibel binden kann [79].

Damit kommt man bei den Untersuchungen der "Hämpolymer"-Modellsubstanzen und der Eisen-Porphyrin-Systemen mit koordinierten Histidinpeptiden zu dem Schluß, daß deren Sauerstoffkomplexe wegen ihres negativen Redoxpotentials in wässrigen Medien ebenso wie die der Peroxidase instabil sind.



R_1 = m-Xylylen-
R_2 = Benzyl-
R_3 = Phenyl-
B = Acetonitril

Abb. 40: Lacunar-Komplex I nach BUSCH et al. [79]

B. EXPERIMENTELLER TEIL

1. Geräte

UV/VIS:	Beckmann Acta M VII Perkin-Elmer Lamda 5
IR:	Beckmann-Spektrometer IR 12
NMR[+)]:	Bruker WH 90, HFX 90 und WP 80
Elementaranalyse[+)]:	Perkin-Elmer 240
Aminosäureanalyse[+)]:	Biotronic LC 6000
CD[+)]:	CD-Spektrometer Dichrographie II
Schmelzpunktbestimmung:	Typ SMP, Fa. Büchi
pH-Meter und Dosimat:	Metrohm, Herisau
Lyophilisator:	Cont. Freeze Dryer, New Brunswick

+)
Für die Aufnahme der Spektren und die Durchführung der Messungen danke ich den Damen und Herren der NMR-Abteilung des Chemischen Instituts der Universität Tübingen, Herrn J. Wurmstich (Elementaranalyse) und Frau M. Munari (Aminosäureanalyse und CD).

2. Chemikalien und Materialien

Grundchemikalien und Reagenzien:	Fa. Merck, Fa. Merck-Schuchardt, Fa. Fluka, Fa. EGA, Fa. Sigma Fa. Serva
Lösungsmittel:	Die verwendeten Lösungsmittel wurden nach [80] getrocknet und gereinigt.
Gase:	Bei Arbeiten unter Schutzgas wurde Dreiring-Stickstoff (Messer-Griesheim) verwendet. Diese Gase wurden zusätzlich über Oxisorb [81] gereinigt.
Dünnschichtplatten:	Kieselgel 60 F_{254}, Kieselgel 6 (Fa. Merck)
Säulenmaterial:	Kieselgel Si 60 (Fa. Merck), Sephadex LH 20 (Fa. Pharmacia)
Spezielle Chemikalien:	Polyoxyethylen $\overline{MG}$ = 10000 (Fa. Hoechst) Hämin aus Rinderblut (Fa. EGA) Albumin aus Rinderblut (Fa. Fluka, Fa. Boehringer)

3. Aminosäure-Derivate als Ausgangsstoffe

3.1. Aliphatische Aminosäure-Derivate

Ausgangsstoffe der aliphatischen Aminosäuren wie Glycin, Alanin, Valin und Leucin werden nach den üblichen Methoden synthetisiert.

Boc-Aminosäuren:	nach CARPINO [82], SCHNABEL [83] und WÜNSCH [84]
Z-Aminosäuren:	nach GRASSMAN et al. [85]
Methylester:	nach FISCHER [86]
Benzylester:	nach ZERVAS et al. [87]
Hydrazid der Z-Aminosäuren:	nach SCHOTT et al. [88]
Pentachlorphenylester der Boc-Aminosäuren:	nach JOHNSON et al. [89]

Die Ausbeuten und Schmelzpunkte dieser Derivate entsprechen den in der Literatur angegebenen Werten.

3.2. Histidin-Derivate

a) L-Histidin-methylester-dihydrochlorid, [H-His-OMe·2 HCl]

31.0 g (0.2 Mol) L-Histidin in 400 ml MeOH werden unter Zugabe von 8 ml konz. H_2SO_4 2 Stdn. unter Rückfluß gekocht. Anschließend leitet man Chlorwasserstoff bis zur sättigung ein und erhitzt 2 Stdn. am Rückfluß. Beim Abkühlen kristallisiert das Produkt aus.
Ausbeute: 41.8 g (90.0 % d.Th.)
Fp.: 201-202°C Lit. [90]: Fp.: 200-201°C

b) N_{Im}-Trityl-L-histidin-methylester-monohydrochlorid, [H-His(Trt)-OMe·HCl] [91]

36.0 g (0.15 Mol) H-His-OMe·2 HCl in 400 ml $CHCl_3$ werden mit 100 ml (0.7 Mol) Triethylamin und anschließend mit 90 g (0.32 Mol) Tritylchlorid bei 2°-3°C versetzt. Nach 12 stündiger Reaktion bei Raumtemperatur wird die Lösung eingeengt, in Ether aufgenommen und das gebildete Triethylammonium-Salz abfiltriert. Das Filtrat wird mit 5 %iger $NaHCO_3$-Lösung und Wasser gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Der erhaltene Dityrityl-L-histidin-methylester wird in 1.5 l Ether gelöst und tropfenweise mit 150 ml HCl gesättigtem Ether versetzt. Das ausgefallene amorphe Dityrityl-L-histidin-methylester-monohydrochlorid wird abfiltriert, mit Ether gewaschen und in 250 ml MeOH im Wasserbad für einige Minuten bei 50-60°C erhitzt. Das beim Abkühlen ausgefallene Triphenylcarbinol wird abfiltriert und das Filtrat eingeengt. Die erhaltene Verbindung wird aus MeOH/Ether umkristallisiert.
Ausbeute: 45.2 g (67.3 % d.Th.)
Fp.: 154-156°C Lit. [91]: Fp.: 145-148°C

^{13}C-NMR-Spektrum in $CDCl_3$: siehe ALLGEMEINER TEIL, Kapitel 3.3.2.

c) Dityrityl-L-Histidin, [Trt-His(Trt)-OH] [92]

Dityrityl-L-Histidin-methylester, dargestellt nach Kapitel 3.2. (b), wird in 200 ml EtOH 1 Std mit 10 g Kaliumhydroxid verseift. Die konzentrierte Lösung wird mit 5 %iger Citronensäure auf pH 3-4 eingestellt und unter Rühren mit 200 ml Ether versetzt. Das gebildete pulvrige Produkt tritt zwischen den beiden Phasen auf und wird abfiltriert. Das erhaltene Produkt wird aus 200 ml EtOH umkristallisiert und mit Ether gewaschen.
Ausbeute: 72.0 g (76.9 % d.Th.)
Fp.: 192-194°C Lit. [92]: Fp.: 189-190°C

Elementaranalyse:

Ber.:	C	82.4 %	H	5.93 %	N	6.55 %
Gef.:	C	82.1 %	H	6.20 %	N	6.62 %

d) N_{α}-tert.-Butyloxycarbonyl-N_{Im}-trityl-L-Histidin, [Boc-His(Trt)-OH] [93]

13.4 g (30 mMol) H-His(Trt)-OMe·HCl, dargestellt nach Kapitel 3.2. (b), in 70 ml Dioxan/Wasser (1:1), werden unter Zugabe von 9 ml Triethylamin bei Raumtemperatur mit 5 ml (35 mMol) Boc-Azid umgesetzt. Nach 12 Std. Stehenlassen wird die Lösung eingeengt und die Verbindung mit Essigester aufgenommen. Die Essigester-Lösung wird mit 5 %iger $NaHCO_3$-Lösung, 5 %iger Citronensäure und Wasser gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Das ölige Produkt, Boc-His(Trt)-OMe (12.5 g), wird in 20 ml Dioxan gelöst und 2 Std. mit 30 ml 2 N NaOH verseift. Die Lösung wird mit 5 %iger Citronensäure neutralisiert und die Verbindung mit $CHCl_3$ extrahiert. Anschließend wird das Produkt aus CH_2Cl_2/Petrolether umkristallisiert.
Ausbeute: 7.3 g (61.7 % d.Th.)
Fp.: 107-109°C Lit. [93]: Fp.: 103°C

Elementaranalyse:

Ber.:	C	72.3 %	H	8.4 %	N	6.4 %
Gef.:	C	72.6 %	H	8.4 %	N	6.2 %

Boc-His(Trt)-OH kann aus H-His(Trt)-OMe·HCl auch in DMF mit Di-tert.-butyl-dicarbonat nach WÜNSCH [84] synthetisiert werden.
Ausbeute: 45.5 % d.Th.

3.3. Serin-Derivate

a) L-Serin-methylester-monohydrochlorid, [H-Ser-OMe·HCl] [94]

Zu 200 ml MeOH setzt man bei -10°C innerhalb von 2 Std. tropfenweise 52 ml frisch destilliertes Thionylchlorid zu. Anschließend werden 21.2 g (0.2 Mol) L-Serin zugegeben und 2 Tage bei Raumtemperatur stehengelassen. Die Lösung wird mehrmals unter Zugabe von MeOH eingeengt und der erhaltene Methylester wird aus MeOH/Ether umkristallisiert.
Ausbeute: 27.0 g (87.0 % d.Th.)
Fp.: 158-159°C Lit. [94]: Fp.: 161-164°C

b) N_{α}-Benzyloxycarbonyl-L-serin-methylester, [Z-Ser-OMe]

31.0 g (0.2 Mol) H-Ser-OMe·HCl in 300 ml $CHCl_3$ werden mit 28 ml Triethylamin und mit 16 ml Chlorameisensäurebenzylester (Z-Cl) versetzt und 1 Std. bei Raumtemperatur gerührt. Nach nochmaliger Zugabe der gleichen Menge Triethylamin und Z-Cl wird die Lösung über Nacht bei Raumtemperatur stehengelassen. Zur Lösung fügt man 2 ml Pyridin. Anschließend wird eingedampft. Der Rückstand wird in Ether aufgenommen und das Triethylammonium-Salz abfiltriert. Das Filtrat wird mit 5 %iger Citronensäure und Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und der Ether im Vakuum abgezogen. Dabei fällt das Produkt als farbloses Öl an.
Ausbeute: 25.3 g (50.0 % d.Th.)

c) N_α-Benzyloxycarbonyl-O-tert.-butyl-L-serin-methylester, [Z-Ser(tBu)-OMe] [95]

23.5 g (0.1 Mol) Z-Ser-OMe in 100 ml CH_2Cl_2 werden unter Zugabe von 1 ml konz. H_2SO_4 bei -5°C mit 100 ml Isobutylen versetzt. Nach 2 tägigem Schütteln bei Raumtemperatur wird die Lösung mit Triethylamin neutralisiert und eingeengt. Der Rückstand wird in 200 ml Essigester aufgenommen, mit 5 %iger $NaHCO_3$-Lösung und Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet. Anschließend wird der Essigester im Vakuum abgezogen. Dabei fällt das Produkt als Öl an.
Ausbeute: 17.1 g (52.0 % d.Th.)

d) N_α-Benzyloxycarbonyl-O-tert.-butyl-Serin, [Z-Ser(tBu)-OH] [95]

16.3 g (0.05 Mol) Z-Ser(tBu)-OMe in 150 ml MeOH werden 2 Std. mit 60 ml 1 N NaOH bei Raumtemperatur verseift. Nach der Neutralisation mit 0.2 N HCl wird die Lösung eingeengt. Der Rückstand wird in Essigester aufgenommen und über Na_2SO_4 getrocknet. Die erhaltene Verbindung wird aus Essigester/n-Hexan umkristallisiert.
Ausbeute: 14.8 g (84.0 % d.Th.)
Fp.: 84-85°C Lit. [95]: Fp.: 86.5-87.5°C

e) N_α-tert.-Butyloxycarbonyl-O-benzyl-L-Serin-dicyclohexylammonium-Salz, [Boc-Ser(Bzl)-OH·DCHA]

5.6 g (30 mMol) L-Serin-O-benzylester [H-Ser(Bzl)-OH] in 80 ml DMF werden nach Zugabe von 4.2 ml Triethylamin mit 7.2 g (33 mMol) Di-tert.-butyldicarbonat versetzt. Nach 2 stündigem Rühren wird die Lösung eingeengt. Der Rückstand wird mit 100 ml 5 %iger Citronensäure versetzt und die freie Säure mit Essigester extrahiert. Anschließend wird mit Wasser gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet.

Danach wird die Essigester-Lösung mit 5.7 ml Dicyclohexylamin (DCHA) umgesetzt und das gebildete DCHA-Salz wird aus Petrolether umkristallisiert.
Ausbeute: 10.5 g (73.4 % d.Th.)
Fp.: 134-135°C Lit. [96]: Fp.: 135-136°C

3.4. Lysin-Derivate

a) N_α-Acyl-N -benzyliden-L-Lysin, [H-Lys(BAL)-OH] [97]

73.1 g (0.4 Mol) L-Lysin-monohydrochlorid in 200 ml 2 N NaOH werden bei 0°C mit 43 ml Benzaldehyd versetzt und 2 Std. gerührt. Das ausgefallene Produkt wird abfiltriert und mit EtOH gewaschen.
Ausbeute: 70.0 g (74.7 % d.Th.)

b) N_α-Benzyloxycarbonyl-L-Lysin, [Z-Lys-OH] [97]

70.0 g (0.3 Mol) H-Lys(BAL)-OH in 150 ml THF unter Zusatz von 150 ml 2 N NaOH werden mit 51 ml (0.3 Mol) Z-Cl und mit 150 ml 2 N NaOH bei -3 bis -5°C tropfenweise versetzt. Anschließend wird diese Lösung zu 50 ml konz. HCl gegeben und 10 Min. bei 50°C erhitzt. Danach wird im Vakuum eingeengt, einmal mit Ether gewaschen und mit 2 N NaOH auf pH 6.2 eingestellt. Nach kurzen Stehenlassen bei 3-4°C wird die filtrierte Lösung im Vakuum eingeengt. Dabei fällt das Produkt aus. Anschließend wird das Produkt mit Ether gewaschen und über P_2O_5 getrocknet.
Ausbeute: 74.5 g (88.0 % d.Th.)

c) N_{α}-Benzyloxycarbonyl-N_{ε}-tert.-butyloxycarbonyl-L-Lysin-dicyclohexylammonium-Salz, [Z-Lys(Boc)-OH·DCHA] [98]

Eine Lösung von 74.0 g (0.264 Mol) Z-Lys-OH in 250 ml Dioxan und 140 ml 2 N NaOH wird mit 40 ml Boc-Azid und 1.5 g Magnesiumoxid versetzt und 1 Tag bei Raumtemperatur gerührt. Die im Vakuum eingeengte Lösung wird mit 5 %iger Citronensäure angesäuert und das ausgefallene Öl mit Essigester extrahiert, mit Wasser gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Der Essigester wird im Vakuum abgezogen. Der Rückstand wird in Ether aufgenommen und mit 40 ml Dicyclohexylamin versetzt. Der gebildete Niederschlag wird filtriert und aus EtOH/Wasser umkristallisiert.
Ausbeute: 70.0 g (47.0 % d.Th.)
Fp.: 155-157°C Lit. [98]: Fp.: 157°C

4. Synthese von "Hämpolymer"-Modellsubstanzen

4.1. Veresterung von POE_{10000} mit Boc-Gly-OH [37]

8.1 g (46.2 mMol) Boc-Gly-OH in 50 ml CH_2Cl_2 werden bei Raumtemperatur mit 23 mMol DCCI versetzt und die Lösung 1 Std. bei 2-3°C gekühlt. Der gebildete DC-Harnstoff wird abfiltriert und das Filtrat zu einer Lösung von 25 g Polyoxyethylen ($\overline{MG}$ = 10000) in 150 ml CH_2Cl_2 unter Zugabe von 3 g 4-Dimethylaminopyridin versetzt und 4 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wird auf etwa 50 ml konzentriert und der Polymer-Ester mit Ether gefällt. Die erhaltene Verbindung $(Boc\text{-}Gly\text{-}POE_{5000})_2$ (22.7 g) wird in 100 ml TfaOH/CH_2Cl_2 (1:1) gelöst und 2 Std. stehengelassen. Aus der eingeengten Lösung wird das POE-Glycin nach Zugabe von Ether gefällt und aus MeOH/Ether umkristallisiert.

Ausbeute: 22.5 g

Glycin-Gehalt: 96.4 % (ca. 1.93×10^{-4} mol/g) der Hydroxy-Gruppen des Polyoxyethylens beladen (laut Aminosäureanalyse)

4.2. Synthese von [Z-Ala-His(Trt)-Lys(Boc)-Leu-Gly-$POE_{5000}]_2$ [37]

Das Pentapeptid-POE wird nach der Liquid-Phase-Peptid-Synthese stufenweise hergestellt (s. ALLGEMEINER TEIL 2.2.4.). Eine etwa 10 %ige Lösung von N_α-ungeschütztem POE-Peptid in CH_2Cl_2 wird mit N-Methylmorpholin auf pH 8-9 eingestellt und mit 5-fachem Überschuß an aktiviertem Aminosäure- bzw. Peptid-Derivat versetzt und 2-4 Tage bei Raumtemperatur stehengelassen. Dabei wird die vollständige Kupplung mit Fluramtest [99] nachgewiesen. Anschließend wird die Lösung eingeengt und das POE-Peptid mit Ether gefällt. Vom erhaltenen POE-Peptid werden die Boc-Gruppen mit 1.2 N HCl/AcOH bzw. die Z-Gruppen mit Wasserstoff unter Zusatz von Pt/C-Katalysator abgespalten und das Produkt aus MeOH/Ether um-

kristallisiert. Das erhaltene N_α-ungeschützte POE-Peptid wird nach der gleichen Methode weiter mit der nächsten Amino-Komponente gekuppelt.
Aminosäure-Gehalt laut Aminosäureanalyse:

	Ala	His	Lys	Leu	Gly
Ber.:	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Gef.:	0.84	0.87	0.92	0.98	1.00

Ausbeute: 1.4×10^{-4} mol/g (70.4 %) in Bezug auf POE.

4.3. Abspaltung der N_ε-Boc- und N_{Im}-Trt-Gruppen vom $[Z\text{-Ala-His(Trt)-Lys(Boc)-Leu-Gly-POE}_{5000}]_2$

4.7 g POE-Peptid, dargestellt nach Kapitel 4.2., wird in 20 ml $TfaOH/CH_2Cl_2$ (1:1) gelöst und 1 Std. bei 2-3°C stehengelassen. Die Lösung wird eingeengt und das Peptid-Polymer mit Ether gefällt und über P_2O_5 getrocknet.
Verbindung: $[Z\text{-Ala-His-Lys-Leu-Gly-POE}_{5000}]_2 \times 2$ TfaOH
Ausbeute: 3.0 g

	Ala	His	Lys	Leu	Gly
Ber.:	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Gef.:	0.88	0.90	0.96	0.96	1.00

4.4. Synthese von Protohämin-dipentachlorphenylester, $[FePP(OPCP)_2]Cl^-$

a) Trichloracetyl-pentachlorphenylester, $[Cl_3CCOOC_6Cl_5]$ [100]

32 g (0.2 Mol) Trichloressigsäure und 15.6 ml Thionylchlorid werden unter Zusatz von 1.6 ml DMF 3 Std. bei 80-85°C erhitzt. Das erhaltene Säurechlorid wird durch Destillation fraktioniert. Dabei geht das nicht umgesetzte Thionylchlorid als Vorlauf über.
Ausbeute: 24.5 (67.5 % d.Th.).
11.3 ml (0.1 Mol) Trichloracetylchlorid und 26.2 g (0.1 Mol) Pentachlorphenol in 300 ml Toluol werden tropfenweise innerhalb 2 Std. mit 8 ml Pyridin versetzt. Die Lösung

wird eingeengt und der Rückstand wird aus Cyclohexan umkristallisiert.
Ausbeute: 36.8 g (89.4 % d.Th.)
Fp.: 124-126°C Lit. [100]: Fp.: 128-130°C
IR_{KBr}: 1820 cm^{-1} (C=O-Valenz)

b) Protohämin-dipentachlorphenylester, $[FePP(OPCP)_2]Cl^-$

6.52 g (10 mMol) Hämin-chlorid in 200 ml DMF werden mit 2.8 ml Triethylamin und 10.0 g (24 mMol) Trichloracetylpentachlorphenylester bei 2-3°C versetzt und über Nacht stehengelassen. Die Lösung wird im Vakuum eingedampft und der Rückstand mit $CHCl_3$ aufgenommen. Nach Zugabe von n-Hexan fällt das Produkt aus und wird mit Ether gewaschen.
Ausbeute: 8.2 g (78.0 % d.Th.)

Elementaranalyse: $C_{43}H_{29}O_4N_4FeCl_{11}$

Ber.:	C 46.6 %	H 2.53 %	N 4.73 %	Cl 32.9 %
Gef.:	C 46.6 %	H 2.62 %	N 4.71 %	Cl 32.6 %

IR_{KBr}: 1820 cm^{-1} (C=O-Valenz), 1000 cm^{-1} (CH_2=CH-Valenz)

4.5. Synthese von POE_{10000}-Gly-Hämin-His-OMe

1.2 g (1 mMol) $[FePP(OPCP)_2]Cl^-$, dargestellt nach Kapitel 4.4. b), und 2 g $(H\text{-}Gly\text{-}POE_{5000})_2$ x 2 AcOH (etwa 0.6 mMol freie Amino-Gruppe) in 10 ml $CHCl_3$ werden mit 0.3 ml N-Methylmorpholin versetzt und 3 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wird abfiltriert und nach Zugabe von Ether wird das Häminpolymer gefällt. Das Produkt wird in 10 ml DMF gelöst mit 0.9 g (3.7 mMol) H-His-OMe·2 HCl und 1 ml N-Methylmorpholin versetzt und 2 Tage bei Raumtemperatur stehengelassen. Die Lösung wird eingeengt und das Häminpolymer mit Ether gefällt. Nach der Umkristallisierung aus MeOH/Ether wird die Verbindung an Sephadex LH 20

(Säulendimension 3.5 x 40 cm) mit Wasser gereinigt. Die erste rote Fraktion wird gesammelt und lyophilisiert.
Ausbeute: 1.2 g
Hämin-Gehalt: 47.3 % (14.1×10^{-5} mol/g) (nach UV-Spektrum des Dipyridin-Ferro-Komplexes)

Andere "Hämpolymer"-Modellsubstanzen wurden nach der gleichen Methode synthetisiert. Die Verbindungen und Ausbeuten werden im ALLGEMEINEN TEIL, Kapitel 2.2.2. zusammengestellt.

5. Synthese von histidinhaltigen Tripeptiden

5.1. Anfärbereagenzien für Dünnschichtchromatographie

Fluram:	auf Amino-Gruppen [99]
Ninhydrin:	auf Amino-Gruppen [102]
Chlor-TDM:	auf Peptidbindungen [103]
Pauly-Reagenz:	auf Histidinreste [104]
Fluoreszenz (285 nm):	auf Schutzgruppen (Trt-, -tBu-, -OPCP)

5.2. Synthese des Histidin-Peptids (H-Leu-His-Ala-OH)

5.2.1. Azid-Verfahren

a) Z-Leu-His-$NHNH_2$ [105]

11.8 g (40 mMol) Z-Leu-$NHNH_2$ werden in 80 ml DMF und 75 ml 2.2 N HCl/THF gelöst und bei -20°C tropfenweise mit 5.2 ml (44 mMol) tert.-Butylnitrit versetzt. Nach 30 Min. Rühren bei -20°C wird die Lösung mit Triethylamin (etwa 25 ml) neutralisiert und anschließend mit 9.6 g (40 mMol) H-His-OMe·2 HCl und 5.6 ml Triethylamin umgesetzt. Nach einmaliger Filtration wird die Lösung über Nacht bei 2°C stehengelassen. Nach Trocknen der Lösung im Vakuum wird das rohe Dipeptid (Z-Leu-His-OMe, 15.1 g) in 150 ml MeOH aufgenommen, mit 10 ml Hydrazin-monohydrat versetzt und 1 Std. bei 60°C anschließend über Nacht bei Raumtemperatur stehengelassen. Das Lösungsmittel wird im Vakuum abgezogen und der Rückstand aus Essigester/Petrolether umkristallisiert. Die Verbindung wird nochmals mit Wasser und Ether gewaschen.

Ausbeute: 5.4 g (31.3 % d.Th.)

Fp.: 160-165°C Lit. [105]: Fp.: 168-169°C

Elementaranalyse:

Ber.: C 57.6 % H 6.9 % N 20.1 %
Gef.: C 56.2 % H 6.8 % N 20.1 %

Aminosäureanalyse:
Leu (1) : His (1) = 1.00 : 0.97

b) Z-Leu-His-Ala-OBzl

2.16 g (5 mMol) Z-Leu-His-$NHNH_2$ werden analog Kapitel 5.2.1. a) mit 1.76 g (5 mMol) H-Ala-OBzl·TosOH gekuppelt. Nach 4 Tage Stehenlassen bei $0^{o}C$ wird die Lösung eingeengt, in Essigester aufgenommen, mit 5 %iger $NaHCO_3$-Lösung und Wasser gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Die Lösung wird eingedampft und das erhaltene Tripeptid aus MeOH/Wasser umkristallisiert.
Ausbeute: 1.4 G (56.0 % d.Th.)
Fp.: 105-107^{o}C

Aminosäureanalyse:
Leu (1) : His (1) : Ala (1) = 1.03 : 1.08 : 1.00

5.2.2. DCCI-Methode ausgehend von der N-terminalen Aminosäure

a) Z-Leu-His(Trt)-OH

13.9 g (30 mMol) Z-Leu-OH·DCHA und 13.4 g (30 mMol) H-His(Trt)-OMe·HCl werden in 70 ml CH_2Cl_2 gelöst und das ausgefallene DCHA-Salz abfiltriert. Das Filtrat wird bei $0^{o}C$ mit 33 mMol DCCI versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur stehengelassen. Der ausgefallene DC-Harnstoff wird abfiltriert und das Filtrat wird mit 5 %iger $NaHCO_3$-Lösung, 5 %iger Citronensäure und Wasser gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Das Solvens wird im Vakuum abgezogen, dabei fällt das Dipeptid als Öl an. Das Produkt

wird in 200 ml MeOH 2 Std. mit 40 ml 1 N NaOH verseift. Die eingeengte Lösung wird mit 50 ml Wasser verdünnt und mit 2 N HCl auf pH 4-5 eingestellt. Das Dipeptid wird mit Essigester extrahiert, mit Wasser gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Aus der konzentrierten Lösung wird das Produkt nach Zugabe von Petrolether umkristallisiert.
Ausbeute: 9.0 g (71.2 % d.Th.)
Fp.: 120-123°C

Elementaranalyse:

Ber.:	C	72.6 %	N	6.4 %	N 8.5 %
Gef.:	C	71.8 %	H	6.3 %	N 8.5 %

b) Z-Leu-His(Trt)-Ala-OBzl

2.6 g (4 mMol) Z-Leu-His(Trt)-OH, 1.8 g (8 mMol) 1-Hydroxybentriazol (HOBt), 1.05 g (5 mMol) H-Ala-OBzl·HCl und 0.7 ml Triethylamin werden in 50 ml THF gelöst, bei 0°C mit 4.4 mMol DCCI zugegeben und 2 Tage bei Raumtemperatur stehengelassen. Der ausgefallene DC-Harnstoff wird abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen. Der Rückstand wird in Essigester aufgenommen, mit 5 %iger $NaHCO_3$-Lösung, 5 %iger Citronensäure und Wasser gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Der Essigester wird im Vakuum abgezogen. Dabei fällt das amorphe Tripeptid aus und wird mit Ether gewaschen.
Ausbeute: 2.15 g (52.3 % d.Th.)
Fp.: 186-189°C

Elementaranalyse:

Ber.:	C	72.9 %	H	6.3 %	N 8.7 %
Gef.:	C	71.6 %	H	6.3 %	N 8.8 %

Aminosäureanalyse:
Leu (1) : His (1) : Ala (1) = 0.84 : 0.89 : 1.00

^{13}C-NMR-Spektrum in $CDCl_3$: Allgemeiner Teil, Kapitel 3.2.2.

c) Z-Leu-His-Ala-OBzl

1.6 g (2 mMol) Z-Leu-His(Trt)-Ala-OBzl in 20 ml CH_2Cl_2 werden bei 4°C unter Zusatz von 2 ml Anisol mit 8 ml Trifluoressigsäure (TfaOH) versetzt und 4 Std. gerührt. Die Lösung wird bei 40°C eingedampft. Der Rückstand wird in Wasser suspendiert und mit verd. Ammoniak-Lösung auf pH 8 eingestellt. Die Verbindung wird mit Essigester extrahiert, mit kaltem Wasser gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Der Essigester wird im Vakuum abgezogen und das erhaltene Tripeptid aus Essigester/Ether/Petrolether umkristallisiert.
Ausbeute: 390 mg (34.7 % d.Th.)
Fp.: 105-107°C

Aminosäureanalyse:
Leu (1) : His(1) : Ala (1) = 1.00 : 0.98 : 1.00

Elementaranalyse:

Ber.:	C	63.9 %	H	6.6 %	N 12.4 %
Gef.:	C	63.8 %	H	6.8 %	N 12.5 %

^{13}C-NMR. Allgemeiner Teil, Kapitel 3.2.2.

d) Z-X-His-Ala-OBzl (X = Gly, Ala, Val, Ser)

Mit der gleichen Methode wurden auch die anderen vier Histidin-Peptide hergestellt. Die Elementaranalyse, Aminosäureanalyse und Fp.- und Rf-Wert des Tripeptids werden in Tabelle 14 zusammengefaßt.

Tab. 14: Ergebnisse der Histidin-Tripeptide

Verbindung	Fp. (°C)	Rf-Wert[+)]	Elementaranalyse	Ber.	Gef.	Aminosäure-analyse	
Z-Gly-His-Ala-OBzl	168-172	0.38	C:	61.5	58.8	Gly	1.01
			H:	5.7	5.9	His	0.98
			N:	13.8	14.0	Ala	1.00
Z-Ala-His-Ala-OBzl	177-178.5	0.46	C:	62.1	61.9	Ala	2.00
			H:	5.9	5.7	His	1.04
			N:	13.4	13.2		
Z-Val-His-Ala-OBzl	150-153	0.55	C:	63.3	62.0	Val	1.04
			H:	6.4	6.3	His	0.97
			N:	12.7	12.4	Ala	1.00
Z-Ser-His-Ala-OBzl	149-154	0.35	C:	60.3	59.0	Ser	0.92
			H:	6.1	5.9	His	0.94
			N:	13.0	12.8	Ala	1.00

[+)] Laufmittel: n-BuOH/AcOH/Wasser = 3:1:1

5.2.3. DCCI-Methode ausgehend von der C-terminalen Aminosäure

a) H-His(Trt)-Ala-OMe·HCl

10 g (20 mMol) Boc-His(Trt)-OH, 3.5 g (25 mMol) H-Ala-OMe·HCl und 2.75 ml Triethylamin werden in 60 ml CH_2Cl_2 gelöst und bei 2-3°C mit 22 mMol DCCI versetzt. Man läßt über Nacht stehen, filtriert den ausgefallenen DC-Harnstoff ab und konzentriert das Filtrat im Vakuum. Der Rückstand wird in Essigester aufgenommen, mit 5 %iger $NaHCO_3$-Lösung, 5 %iger Citronensäure und Wasser gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Beim Abziehen des Lösungsmittels im Vakuum fällt das Dipeptid als Öl an [Boc-His(Trt)-Ala-OMe (10.7 g)]. Die erhaltene Verbindung wird in 40 ml Dioxan gelöst und 1 Std. bei Raumtemperatur gerührt. Aus der konzentrierten Lösung wird das N_α-ungeschützte Dipeptid nach Zugabe von Ether umkristallisiert.
Ausbeute: 9.4 g

Die Elementaranalyse des Dipeptids zeigte jedoch einen zu geringen Gehalt an Kohlenstoff (Ber.: 67.3 %, Gef.: 59.6 %), da die N_{Im}-Trityl-Gruppen unter den Reaktionsbedingungen teilweise gespalten wurde.

b) H-His-Ala-OMe·2 HCl

31.3 g (50 mMol) Trt-His(Trt)-OH, 7.7 g (55 mMol) H-Ala-OMe · HCl und 8.4 ml Triethylamin werden in 150 ml CH_2Cl_2 gelöst und bei 2-3°C mit 11.3 g (55 mMol) DCCI versetzt. Nach Stehenlassen über Nacht filtriert man den ausgefallenen DC-Harnstoff ab, wäscht das Filtrat mit 5 %iger $NaHCO_3$-Lösung, 5 %iger Citronensäure und Wasser und trocknet es über Na_2SO_4. Das Lösungsmittel wird im Vakuum abgezogen

und das erhaltene Dipeptid aus Essigester umkristallisiert [Trt-His(Trt)-OMe] (30.8 g, 84.9 % d.Th.). Das Dipeptid wird in 100 ml MeOH gelöst und mit 100 ml Ameisensäure versetzt. Nach 20 Min. Stehenlassen wird das ausgefallene Triphenylcarbinol abfiltriert und das Filtrat im Vakuum eingeengt. Durch dreimaliges Wiederholen dieses Verfahrens erfolgt die vollständige Spaltung der Trityl-Gruppen. Das Filtrat wird eingeengt und der Rückstand wird in 50 ml 2 N HCl aufgenommen, mit $CHCl_3$ und Ether gewaschen und lyophilisiert.
Ausbeute: 11.4 g (76.7 % d.Th.)
Fp.: 87-90°C

Elementaranalyse:

Ber.:	C	38.6 %	H	5.8 %	N	18.0 %
Gef.:	C	38.5 %	H	5.7 %	N	18.1 %

H-His-Ala-OMe·2 HCl kann auch aus Boc-His(Trt)-OMe, dargestellt nach Kapitel 5.2.2. a), mit der gleichen Methode synthetisiert werden.

c) H-Leu-His-Ala-OH·2 HCl

1.8 g (6 mMol) H-His-Ala-OMe·2 HCl, 3.12 g (6.5 mMol) Boc-Leu-OPCP und 1.32 ml N-Methylmorpholin werden in 25 ml DMF gelöst und über Nacht bei Raumtemperatur stehengelassen. Die Lösung wird im Vakuum eingedampft und der Rückstand in Essigester aufgenommen, mit 5 %iger $NaHCO_3$-Lösung und Wasser gewaschen, und über Na_2SO_4 getrocknet. Anschließend wird der Essigester eingedampft und das erhaltene Tripeptid, Boc-Leu-His-Ala-OMe, wird zuerst 1 Std. mit 10 ml 1 N NaOH verseift. Dann wird die Lösung mit 6 N HCl auf pH 1-2 eingestellt. Nach einigen Minuten wird die Lösung im Vakuum eingedampft und der Rückstand mit MeOH aufgenommen. Das in MeOH schwer lösliche Kochsalz wird abfiltriert und das Filtrat auf dem Wasserbad bei 60-70°C

eingeengt. Der Rückstand wird in 10 ml 1 N HCl aufgenommen, mit Ether gewaschen und die Lösung lyophilisiert. Das Tripeptid fällt als leicht gelbe Kristalle an.
Ausbeute: 0.88 g (36.0 % d.Th.).

Aminosäureanalyse:
Leu (1) : His (1) : Ala (1) = 0.96 : 1.01 : 1.00

Elementaranalyse:

Ber.:	C	43.9 %	H	6.6 %	N 17.1 %
Gef.:	C	43.7 %	H	7.2 %	N 16.8 %

d) H-X-His-Ala-OH 2 HCl (X = Gly, Ala, Val, Ser)

Die anderen vier Histidin-Peptide wurden nach der gleichen Methode dargestellt. Die Ausbeuten der Histidin-Peptide lagen allgemein zwischen 25-35 % d.Th. Der Rf-Wert und die Aminosäureanalyse der Histidin-Peptide werden in Tabelle 15 zusammengestellt.

Tab. 15: Rf-Wert, Elementaranalyse und Aminosäureanalyse der Histidin-Tripeptide

H-X-His-Ala-OH (X)	Rf-Wert[+)]	Elementaranalyse	Ber. (%)	Gef.(%)	Aminosäure-analyse	
Gly	0.07	C:	37.3	39.0	Gly(1)	0.90
		H:	5.4	6.3	His(1)	1.00
		N:	19.8	18.1	Ala(1)	1.00
Ala	0.85	C:	39.1	38.4	Ala(2)	2.20
		H:	5.7	5.3	His(1)	1.00
		N:	19.8	18.3		
Val	0.10	C:	42.4	43.0	Val(1)	0.99
		H:	6.3	7.0	His(1)	1.00
		N:	17.7	16.5	Ala(1)	0.96
Ser	0.26	C:	37.5	37.6	Ser(1)	0.94
		H:	5.5	5.2	His(1)	1.00
		N:	18.2	17.8	Ala(1)	0.98

[+)] Laufmittel: n-Butanol/Eisessig/Wasser = 3:1:1

6. Methoden zur UV-spektroskopischen Untersuchungen

Die UV-spektroskopischen Untersuchungen der Eisen-Porphyrin-Systemen in wässrigen Medien wurden nach der Methode [44] durchgeführt.

a) pH- und Konzentrationseinstellung der Hämpolymer-Lösungen

0.02 mM Hämpolymer-Lösung in 0.1 M KH_2PO_4 (etwa pH 5.8). Jeweils 10 ml werden mit 1 N NaOH auf einen bestimmten pH-Wert eingestellt und mit Wasser auf 20 ml verdünnt.

b) Reduktion des Hämpolymers mit Dithionit-Lösung

Die erhaltene Hämpolymer-Lösung (jeweils 5 ml) wird in 80 ml Glasrohr mit einer 1 cm Quarzküvette und einer Gummikappe umgesetzt und durch N_2-Gas-Vakuum-Zyklen Sauerstoff-Gas entfernt. Zur Lösung injiziert man tropfenweise eine N_2-gesättigte Natriumdithionit-Lösung (etwa 20 mg in 25 ml 0.01 N NaOH) mit einer 1 ml Spritze durch die Gummikappe. Dabei wird die vollständige Reduktion des Hämpolymers mit ein oder zwei Tropfen der Dithionit-Lösung (etwa 10 bis 30 µl) erreicht. Die überschüssige Zugabe von Dithionit-Lösung kann man bei der UV-Absorption des Dithionit-Ions (315 nm = 8000) regulieren. Bei längerem Stehenlassen der Dithionit-Lösung wird das unerwünschte Hydroperoxid gebildet, daher mußt man die Dithionit-Lösung bei jeder Untersuchung frisch vorbereiten.

c) CO-Komplex und seine Stabilität gegenüber Sauerstoff

Die CO-gesättigte Ferri-Hämpolymer-Lösung wird mit der Dithionit-Lösung reduziert, wobei der CO-Komplex entsteht. Zur Lösung setzt man mit einer Spritze je 1 ml Sauerstoff zu unter ständigem Rühren der Lösung. Anschließend wird das entstandene UV-Spektrum aufgenommen.

d) Redoxpotentialbestimmung des Hämpolymers

Zur einer 5 ml 0.01 mM Hämpolymer-Lösung (pH 7) gibt man 1 ml 0.08 mM Redoxindikator (0.05 M Phosphat-Puffer pH 7). Anschließend wird mit einer 1 ml Spritze eine N_2-gesättigte Dithionit-Lösung (etwa 10 mg Natriumdithionit in 50 ml 0.01 N NaOH) tropfenweise zutitriert. Dabei erfolgt die vollständige Reduktion des Hämpolymers und des Indikators bei Zugabe von etwa 5 bis 8 Tropfen der Dithionit-Lösung.

Die Untersuchungen des an Histidin-peptid gebundenen Hämpolymers (1) wurden nach der gleichen Methode durchgeführt.

C. ZUSAMMENFASSUNG

Die koordinative Bindung von Histidinpeptiden an Eisen-Porphyrin in wässrigen Medien wird beschrieben. Dabei können die Eisen-Porphyrin-Derivate durch die Fixierung der Polyoxyethylen-Kette in Wasser solubilisiert werden. Diese Eisen-Porphyrin-Systeme wurden ausgehend vom Dipentachlorphenylester des Protohämins (Eisen-Protoporphyrin IX) synthetisiert.

Ihre physikalischen und chemischen Eigenschaften in wässrigen Medien sowie Aggregation, Komplexbildungsverhalten und Reaktivität gegenüber Sauerstoff und Kohlenmonoxid wurden im Vergleich mit natürlichen Hämproteinen untersucht. Der Eisen-Porphyrin-Komplex, Z-Ala-His-Lys-(Häm-His-OMe)-Leu-Gly-POE_{10000}, bildet unter Wirkung von Sauerstoff einen Ferryl-oxo-Komplex, wofür zwei Reaktionsmechanismen diskutiert wurden.

Fünf histidinhaltige Tripeptide wurden mit Einführung der Trityl-Schutzgruppe am Histidinrest synthetisiert.

Durch CD- und NMR-spektroskopische Untersuchungen wurde die Konformation der Histidin-Peptide untersucht.
Die Komplexbildung der Histidin-Peptide mit Eisen-Porphyrinen in wässrigen Medien wird von den intramolekularen Wechselwirkungen des Histidin-Peptids beeinflußt, was mit natürlichen Hämproteinen verglichen werden kann. Der Sauerstoff-Komplex der vorgestellten Eisen-Porphyrin-Systeme ist vor allem in wässrigen Medien bei Raumtemperatur nicht stabil, was durch sein negatives Redoxpotential erklärt werden kann.

Der instabile Sauerstoff-Komplex wurde auch bei der Photodissoziation des CO-Komplexes in Anwesenheit von Sauerstoff beobachtet.

D. LITERATURVERZEICHNIS

[1] M.F. PERUTZ, et al., Nature 185, 416 (1960)

[2] J.C. KENDREW, et al., nature 185, 422 (1960)

[3] J.C. KENDREW, et al., Nature 209, 339 (1966)

[4] W. BOLTON und M.F. PERUTZ, Nature 228, 726 (1970)

[5] E.A. PADLAN und W.E. LOVE, Nature 220, 376 (1968)

[6] W. BOLTON und M.F. PERUTZ, Nature 228, 551 (1970)

[7] S.E.V. PHILIPS, Nature 273, 247 (1978)

[8] L.D. BROWN und K.N. RAYMOND, Inorg. Chem. 14, 2595 (1975)

[9] A. DEDIEU, et al., J. Amer. Chem. Soc. 98, 5789 (1976)

[10] C.A. REED, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 1780 (1977)

[11] D.A. CASE, et al., J. Amer. Chem. Soc. 101, 4433, (1979)

[12] W.A. EATON, et al., J. Amer. Chem. Soc. 100, 4991 (1979)

[13] G.H. LOEW, et al., Int. J. Quantum Chem. Quant. Biol. Symposium 5, 403 (1978)

[14] E. BAYER, et al., Structure and Bonding 2, 181 (1967)

[15] J.H. WANG, Acc. Chem. Res. 3, 90 (1970)

[16] a) C.K. CHANG, et al., J. Amer. Chem. Soc. 96, 5595 (1974)

b) J.E. BALDWIN, et al., J. Amer. Chem. Soc. 97, 227 (1975)

c) H. OGOSHI, et al., Tetrahedron Lett. 49, 4477 (1976)

[17] a) J.P. COLLMAN, et al., J. Amer. Chem. Soc. 97, 1427 (1975)

b) J.P. COLLMAN, Acc. Chem. Res. 10, 265 (1977)

[18] W.S. BRININGER, et al., J. Amer. Chem. Soc. 96, 5595 (1974)

[19] T.G. TRAYLOR, et al., J. Amer. Chem. Soc. 96, 5597 (1974)

[20] T.G. TRAYLOR, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 1166 (1975)

[21] R.J.P. WILLIAMS, "The Enzymes", Vol. 1, p. 391, 2nd Ed., Academic Press, New York (1959)

[22] R.W. HENDERSON, et al., "Handbook of Biochemistry", p. J-35, 2nd Ed.

[23] R. MAKINO, et al., J. Biol. Chem. 255, 11883 (1980)

[24] I.C. GUNSALUS, et al., "Molecular Mechanism of Oxygen Activation", p. 559, Academic Press, New York (1974)

[25] a) C.E. CASTRO, J. Theor. Biol. 33, 475 (1971)
b) Ibid., "The Porphyrins", Vol. V, Chap. 1, Academic Press, New York (1978)

[26] J.S. VALENTINE, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 1009 (1979)

[27] M.F. PERUTZ, et al., Nature 228, 551 (1970)

[28] a) G.N. LA MAR, et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 90, 36 (1979)
b) J. TERAOKA, et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 93, 694 (1980)

[29] a) K. NAGI, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 2033 (1980)
b) P. STEIN, et al., J. Amer. Chem. Soc. 102, 7797 (1980)

[30] L. ROSSI-BERNARDI, et al., Physiol. Rev. 53, 836 (1973)

[31] R.E. BENESCH, et al., Adv. Protein Chem., 28, 211 (1974)

[32] P.W. HOCHACHKA, et al., "Strategien biochemischer Anpassung", Kap. 10, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1980)

[33] E. ANTONINI, et al., "Hemoglobin and Myoglobin in their Reactions with Ligands", North-Holland (1971)

[34] E. BAYER, et al., Angew. Chem. 89, 120 (1977)

[35] G. HOLZBACH, Dissertation, Universität Tübingen (1979)

[36] Ch. HOMANN, Dissertation, Universität Tübingen (1979)

[37] M. SCHLEINZER, Dissertation, Universität Tübingen (1982)

[38] a) E. BAYER und M. MUTTER, Chem. Ber. 107, 1344 (1974)
b) M. MUTTER, Dissertation, Universität Tübingen (1972)

[39] a) A.C. MAEHLY, et al., Acta. Chem. Scand. 12, 1259 (1958)
b) S.B. BROWN, et al., Biochem. J. 117, 773 (1970)
c) Ibid., 153, 279 (1976)

[40] J. SILVER und B. LUKAS, Inorg. Chim. Acta 78, 773 (1970)

[41] S. BAGGER und R.J.P. WILLIAMS, Acta Chem. Scand. 25, 976 (1971)

[42] I. YAMAZAKI, "Molecular Mechanism of Oxygen Activation", Chap. 13, Academic Press, New York (1974)

[43] E. ANTONINI, "Oxygen in the Animal Organism", Pregamon Press, London (1964)

[44] J.B. WITTENBERG, et al., J. Biol. Chem. 242, 626 (1967)

[45] M. TAMURA und I. YAMAZAKI, J. Biol. Chem. 171, 311 (1972)

[46] I. YAMAZAKI, "Molecular and Celluar Biochemistry", 2, 39 (1973)

[47] R.J.P. WILLIAMS, et al., "New Trends in Bio-inorganic Chemistry", Chap. 5, Academic Press, London (1978)

[48] A.S. Brill, "Comprehensive Biochemistry", Vol. 14, Chap. X, Elsevier, Amsterdam (1966)

[49] a) B.C. SAUNDERS, et al., "Peroxidase", Butterworths, London (1964)
b) R.J.P. WILLIAMS, Chem. Rev. 56, 299 (1956)

[50] a) J.H. FURHOP, Angew. Chem. 10, 363 (1974)
b) ibid., "Bio-organische Chemie", S. 112 ff., Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1982)

[51] D.O. LAMBETH und G. PALMER, J. Biol. Chem. 248, 6095 (1973)

[52] E. ANTONINI, et al., Biochem. J. 141, 265 (1974)

[53] T.L. POULOS, et al., J. Biol. Chem. 255, 575, 8199 (1980)

[54] B.A. WITTENBERG, et al., Biochemistry 6, 1970 (1967)

[55] a) W.M. CLARK, "Oxidation-Reduction Potentials of Organic Systems", Willams & Willkins Co., USA (1960)

b) F. ENDER, "Handbuch der Physiologisch- und Pathologisch-Chemischen Analyse", Bd. I, S. 628 ff. (1954)

[56] S.F. VELIK, et al., J. Biol. Chem. 221, 265 (1965)

[57] a) R. COWGILL und W.M. CLARK, J. Biol. Chem. 198, 33 (1952)

b) R. BANERJEE, J. Chim. Phys. 57, 615 (1960)

[58] a) G.C. WARGNER und R.J. KASSNER, Biochem. Biophys. Acta 392, 319 (1975)

b) C.-M. WANG und W.S. BRINIGER, Biochemistry 18, 4960 (1979)

[59] a) E. TSUCHIDA, et al., Polymer J. 14, 629 (1982)

b) E. TSUCHIDA, et al., J. Inorg. Biochem. 17, 283 (1982)

[60] a) H.-P. SEELMANN-EGGEBERT, Dissertation, Universität Tübingen (1983)

b) M. KECK, Dissertation,Universität Tübingen (in Vorbereitung)

[61] N. NANZYO und SANO, J. Biol. Chem. 243, 3431 (1968)

[62] T.G. TRAYLOR, et al., J. Amer. Chem. Soc. 101, 6716 (1979)

[63] M. BODANSZKY und J. MARTINEZ, "Synthese", S. 333 ff. Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1981)

[64] E. WÜNSCH, "Methode der Organischen Chemie", Bd. XVI/1, S. 537 ff., Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1974)

[65] G. LOSSE, et al., Tetrahedron 33, 1519, 1813 (1977)

[66] a) W. STÜBER, Dissertation, Universität Tübingen (1983)

b) M. DENGLER, Dissertation, Universität Tübingen (1983)

[67] a) C. GRATHWOHL und K. WÜTHRICH, J. Magn. Reson. 13, 217 (1974)

b) W. VOELTER, et al., Z. Naturforsch. 266, 213 (1971)

[68] a) W.F. RAYNOLDS, et al., J. Amer. Chem. Soc. 95, 328 (1973)

b) R. DESKAURIES, et al., Biochemistry 13, 3443 (1974)

[69] a) I. ASAHIKAWA und K. ITOH, Chem. Lett., 681 (1978)

b) M. TANOKURA, Biophys. Biochem. Acta 742, 576 (1983)

[70] A. YOKOYAMA, et al., Bl. Chem. Soc. Japan 47(1), 112 (1974)

[71] T. TRAN, et al., Biochim. Biophys. Acta 492, 245 (1977)

[72] H. JÄCKEL, et al., Biopolamers 20, 65 (1981)

[73] T. HAETLE, et al., Int. J. Biol. Macromol. 4, 335 (1982)

[74] I.D. STONG und C.H. HARZELL, Bioinorg. Chem. 5, 219 (1976)

[75] a) J.-H. A. AKOYUNOGLOU, et al., Biochemistry 2, 1033 (1963)

b) H. GOFF und L.O. MORGAN, Inorg. Chem. 15, 2076 (1976)

[76] T.G. TRAYLOR, et al., J. Amer. Chem. Soc. 100, 3576 (1978)

[77] C.W. CARTER, Jr., J. Biol. Chem. 252, 7802 (1977)

[78] T.L. POULOS und J. KRAUT, J. Biol. Chem. 255, 8199 (1980)

[79] D.H. BUSCH, et al., J. Amer. Chem. Soc. 105, 6585 (1983)

[80] D.D. PERRIN und W.L.F. ARMAREGO, "Purification of Laboratory Chemicals", Pergamon, Oxford (1980)

[81] Nachr. Chem. Techn. 16, 260 (1968)

[82] L.A. CARPINO, J. Amer. Chem. Soc. 79, 98 (1957); ibid., 79, 4427 (1957)

[83] E. SCHNABEL, Liebigs Ann. Chem. 702, 188 (1967)

[84] E. WÜNSCH, et al., Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 357, 1651 (1976)
[85] W. GRASSMANN und E. WÜNSCH, Chem. Ber. 91, 462 (1958)
[86] E. FISCHER, Ber. dtsch. Chem. Ges. 39, 2893 (1906)
[87] L. ZERVAS, et al., J. Org. Chem. 22, 1515 (1957)
[88] H. SCHOTT, et al., J. Org. Chem. 12, 490 (1947)
[89] B. JOHNSON, et al., J. Org. Chem. 33, 4521 (1968)
[90] N.C. DAVIS, J. Biol. Chem. 223, 935 (1956)
[91] L. ZERVAS, et al., J. Amer. Chem. Soc. 81, 2884 (1959)
[92] G. LOSSE und G. MÜLLER, Helv. Chim. Acta 44, 2768 (1961)
[93] G. LOSSE und U. KRYCHOWSKY, J. Prak. Chem. 312, 1097 (1970)
[94] S. GUTTMAN, Helv. Chim. Acta 41, 1852 (1958)
[95] E. SCHRÖDER, Liebigs Ann. Chem. 670, 127 (1958)
[96] H. OTSUKA, et al., Bl. Chem. Soc. Japan 39, 1171 (1966)
[97] M. BERGMANN und L. ZERVAS, J. Biol. Chem. 111, 249 (1935)
[98] E. WÜNSCH, et al., Chem. Ber. 97, 3305 (1964)
[99] A. FLEX und M.H. JIMINEZ, J. Chromat. 89, 361 (1974)
[100] D.J. MACCALDIN, Chem. Rev. 60, 39 (1960)
[101] K. DÜRING, Diplomarbeit, Universität Tübingen (1984)
[102] E. VON ARX, et al., J. Chromat. 120, 224 (1976)
[103] M.R. GRIMMETT und E.L. RICHARDS, J. Chromat. 20, 171 (1965)
[104] K. BÜRGER, Z. Anal. Chem. 224, 421 (1967)
[105] R. SCHWYZER, et al., CIBA Akt. Gesell. Basel, Da.S. 1, 125 942 (1957)

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren

E. Bayer, M. Hanack, G. Jung, I.P. Lorenz, H. Oberhammer,
H. Pauschmann, J. Strähle, W. Voelter.

LEBENSLAUF

Kenichi Shinohara

15.07.1951	geboren in Nagano als Sohn des Tierarztes Juichi Shinohara und seiner Frau Ayako, geborene Ohta
1958 - 1964	Grundschule in Nagano
1964 - 1967	Mittelschule in Nagano
1967 - 1970	Nagano-Senior-High-School, Nagano
Feb. 1970	Eintrittsprüfung an der Waseda Universität, in Tokyo
1970 - 1979	Studium der Angewandten Chemie
März 1979	Bachelor of Engineering in Department of Applied Chemistry
1979 - 1981	Studium des Master Programms der Angewandten Chemie an der Waseda Universität in Tokyo
Oktober 1979 - Januar 1981	Arbeit bei Prof. Dr. E. Bayer, Institut für Organische Chemie, Universität Tübingen im Rahmen einer Zusammenarbeit zwischen Prof. Dr. E. Bayer und Prof. Dr. E. Tsuchida, Waseda Universität in Tokyo
Februar 1981	Master of Engineering in Department of Applied Chemistry Arbeit: "^{1}H- and ^{13}C-Nuclear Magnetic Resonance Research on Structural Properties of 'Picket-Fence'-Porphyrins"
23.4.1981	Zulassung als Doktorand bei Prof. Dr. E. Bayer, Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen
Mai 1981 - April 1984	Experimenteller Teil der Dissertation am Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Ernst Bayer, mit dem Thema "Bindung von Histidin-Peptiden an polymerfixierte Porphyrinsysteme"

D. GRÄBNER
Dissertations- u. Offsetdruckerei
Gotenstraße 3
8602 Altendorf bei Bamberg
Telefon 09545 / 8791